

Dissertation mit dem Schwerpunkt Biologie

**Vergleichende Analyse Fluorid-induzierter
Veränderungen des Dentins permanenter
Backenzähne von Paarhufern (Artiodactyla;
Cervidae und Suidae)**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades**

Vorgelegt von Dipl.-Biol. Heiko Richter

Institut für Biologie und Chemie , Universität Hildesheim

Abteilung für Biologie

Hildesheim 2011

Für Maren

Inhaltsverzeichnis

Liste der zusammengefassten Arbeiten.....	3
1. Einleitung	4
2. Dentin.....	7
2.1. Frühe Odontogenese	7
2.2. Dentinogenese	9
2.3. Struktur des Dentins unter Berücksichtigung der Nomenklatur	11
3. Die untersuchten Arten und ihre Dentitionen im Verlauf der Ontogenese	26
3.1. Das Reh (<i>Capreolus c. capreolus</i> L. 1758)	26
3.2. Der Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i> L. 1758)	30
3.3. Das Wildschwein (<i>Sus scrofa</i> L. 1758)	33
4. Material und Methoden.....	38
4.1. Probenmaterial	38
4.2. Knochenfluoridbestimmung	39
4.3. Allgemeine Vorbereitung und Untersuchung der Zahnproben	39
4.4. Histologie	39
4.5. Mikroradiographie	40
4.6. Rasterelektronenmikroskopie.....	41
4.7. Mikrosondenanalyse.....	41
5. Die Odontogenese unter Einwirkung von Fluorid.....	44
5.1. Makroskopische Befunde der Dentalfluorose	44
5.2. Mikroskopische Befunde im Zahnschmelz.....	47
5.3. Fluorid-induzierte mikroskopische Veränderungen im Dentin.....	48
5.4. Elementanalyse.....	52
6. Diskussion	58
6.1. Fluor	58
6.2. Fluoridmetabolismus im Säugetierkörper	60
6.3. Auswirkungen von Fluorid auf die Amelogenese	62
6.4. Auswirkungen von Fluorid auf die Dentinogenese	63
7. Technische Aspekte und Methodenkritik	71
7.1. Histologie	72
7.2. Mikroradiographie	73
7.3. Rasterelektronenmikroskopie.....	74
7.4. Mikrosonde	76

7.5.	Fazit	76
8.	Zusammenfassung	78
9.	Literaturverzeichnis	80
10.	Vollständige Liste der Publikationen mit eigener Beteiligung	98
11.	Danksagung	100
12.	Anhang	102

Liste der zusammengefassten Arbeiten

Richter, H.; Kierdorf, U.; Richards, A.; Kierdorf, H.; (2010) Dentin abnormalities in cheek teeth of wild red deer and roe deer from a fluoride-polluted area in Central Europe; *Ann Anat* 192 (2): 86-95

Richter, H.; Kierdorf, U.; Richards, A.; Melcher, F.; Kierdorf, H.; (2011) Fluoride concentration in dentine as a biomarker of fluoride intake in European roe deer (*Capreolus capreolus*) – an electron-microprobe study. *AOB* in press

1. Einleitung

Die exzessive Aufnahme von Fluorid während der Odontogenese bedingt charakteristische pathologische Veränderungen insbesondere der Zahnhartsubstanzen, auch bekannt als Dentalfluorose (Aoba und Fejerskov 2002; Fejerskov et al. 1988, 1996; WHO 2002). Die fluorid-induzierten Veränderungen der Zähne reflektieren Störungen der Prozesse, die an der Bildung der Zahnhartgewebe beteiligt sind. Makroskopisch sichtbar sind diese Veränderungen als Veränderungen des Zahnschmelzes als Konsequenz der gestörten Amelogenese (Aoba und Fejerskov 2002; Fejerskov et al. 1988, 1996, Kierdorf H et al. 1996a, 2004, Kierdorf U et al. 1993, Kierdorf U und H 2000, Shupe et al. 1983; Suckling et al. 1988). Bei verschiedenen Huftierarten wurden die Veränderungen der Struktur und Mineralisation des Schmelzes in Folge gesteigerter Fluoridexposition beschrieben (Karstad 1967; Kierdorf H und Kierdorf U 1989, 1997; Kierdorf H et al. 1996a, b, 1997, 2000; Kierdorf U et al. 1993 Suttie 1987; Vikøren und Stuve, 1996). Die charakteristische Verteilung von fluorid-induzierten Schmelzveränderungen der permanenten postcaninen Dentition bei Cerviden wurde der Entwicklungssequenz der Dentition zugeordnet (Kierdorf U und Kierdorf H 2000; Kierdorf U et al. 1993). Auf Basis dieser Beobachtungen wurde eine Hypothese über verschiedene Mechanismen zur Protektion gegen erhöhte Fluoridbelastungen während bestimmter Phasen der Ontogenese des Cervidengebisses entwickelt (Kierdorf U und H 2000). Pathologische Veränderungen im Zahnschmelz fluorid-exponierter Wildschweine sind ebenfalls beschrieben (Kierdorf H et al. 2000). Gleichsinnige Veränderungen konnten in einem experimentellen Ansatz durch Zufütterung von Fluorid in den Zähnen von Miniaturschweinen erzeugt werden (Kierdorf H et al. 2004).

Um genauere Aussagen über den chronologischen Verlauf einer fluorotischen Belastung während der Odontogenese treffen zu können, besteht die Möglichkeit neben der Knochenfluoridbestimmung ein Profil der Fluoridkonzentration entlang des Mineralisierungsverlaufes eines Zahnes zu erstellen (Kierdorf U et al. 1991; Nelson et al 1989; Richards et al. 1994). Dazu stehen verschiedene analytische Verfahren, wie z.B. die Protonensonde, Säure-Ätztechnik oder eine Elektronenmikrosonde, zur Verfügung. Während der Knochenfluoridgehalt einen akkumulierten Wert der Fluoridaufnahme über die gesamte Lebenszeit eines Individuums repräsentiert, zeigt ein Fluorid-Profil durch einen Zahn entlang des Mineralisierungsverlaufes Schwankungen der Fluoridinkorporation an, welche durch

verschiedene Einflüsse entstehen. Unter Einbezug des Dentins, welches zeitlebens wächst, ist das erfasste Zeitfenster wesentlich größer, als bei alleiniger Betrachtung des Schmelzes. Allerdings sind verschiedene Zuwachsraten während der Dentinogenese zu berücksichtigen. Für die vorliegende Studie wurde die Elektronenmikrosonde zur Erfassung der Inkorporation von Fluorid in die Zahnhartsubstanzen verwendet.

Cerviden sind sehr gut als Bioindikatoren zur Erfassung der Fluoridbelastungen ihrer Habitate geeignet (Kierdorf U und H 1999, Kierdorf H et al. 1996a, 1999; Zemek et al. 2006). Für die Studien an Cerviden wurde ein Index (Dental Lesion Index, DLI) für die fluorotischen Zähne etabliert, um makroskopisch sichtbare Schädigungen quantitativ zu erfassen. Dieser Index ist bei chronisch belasteten Tieren positiv mit dem Knochenfluoridgehalt der betroffenen Individuen korreliert. Die Proben der vorliegenden Studie wurden nach den Kriterien des DLI und des Knochenfluoridgehaltes ausgesucht, für die Schweine mussten die makroskopische Betrachtung und der Knochenfluoridgehalt genügen, da kein dem DLI äquivalenter Index für diese Art existiert.

Ziel der vorliegenden Studie ist (erstens) die Erfassung des Spektrums fluorid-induzierter Veränderungen der Struktur und Mineralisation des Dentins von Cerviden (Reh und Rothirsch) und von Wildschweinen. In der vorliegenden Zusammenfassung werden zunächst die Grundlagen der Entwicklung und Struktur des Dentins beschrieben. Dazu gehören die Beschreibungen der allgemeinen Odontogenese, des Ablaufs der Dentitionen der behandelten Arten und ein Überblick über die Wechselwirkungen des Fluorids auf den Organismus mit Fokus auf die Odontogenese. Dazu werden mit histologischen und mikroradiographischen Methoden die fluorid-induzierten Pathologien im Dentin beschrieben und in Bezug zum Knochenfluoridgehalt und zu dem DLI gesetzt werden.

Zum zweiten verfolgte die Arbeit das Ziel der Entwicklung eines Bewertungsschemas für die Beurteilung der fluorid-induzierten Veränderungen der Struktur und Mineralisierung im Dentin. Ein solches Bewertungsschema ermöglicht es den Schädigungsgrad einzelner Zähne intraindividuell und zwischen Individuen semiquantitativ zu erfassen.

Drittens sollte anhand der Verteilung der Mineralisationsdefekte und der Fluoridkonzentration im Dentin die Hypothese geprüft werden, ob einzelne

Abschnitte der Ontogenese bei Reh und Rothirsch gegen eine Fluoridbelastung abgeschirmt sind.

Die Einbeziehung des Dentins in die Bewertung fluorid-induzierter Aberration sollte viertens klären, inwieweit die Einbeziehung dieser Hartsubstanz in entsprechende Analysen es erlaubt, das ontogenetische Zeitfenster für die Beurteilung der Fluoridbelastung auf ein Individuum gegenüber demjenigen bei ausschließlicher Betrachtung der Amelogenese zu erweitern.

2. Dentin

Zum Verständnis der Veränderungen im Dentin der untersuchten Artiodactyla ist es notwendig, die genaue Struktur des Dentins und den Verlauf der regulären Dentinogenese zu beschreiben. Die Odontogenese der plazentalen Säuger und die Strukturen der beteiligten Hartgewebe sind vor allem für den Menschen in entsprechenden Lehrbüchern beschrieben (z.B. Avery 1994; Berkovitz et al. 1980; Nanci 2008, Schmidt 1958, Schroeder 2000, Warshawski 1980). Detaillierte Beschreibungen zur Chronologie der Odontogenese der Cerviden (vor allem des Rehes) unter Berücksichtigung der frühen Dentinogenese wurden von Kierdorf H (1988) und Kierdorf H und Kierdorf U (1989) vorgelegt. Angaben zur chronologischen Entwicklung der Hartsubstanzen im Gebiss des Rothirsches liegen z.B. von Brown et al. (1991a, 1991b) vor. Die Beschreibung der Dentinogenese bezieht sich im Folgenden – soweit nicht anders gekennzeichnet – auf die genannten Quellen. Vergleicht man die Dentinogenese verschiedener Arten, so sind erste Bildungen des Dentins generell in der Embryonalentwicklung zu beobachten. Gleiche Zähne im Gebiss verschiedener Arten (in Kapitel 3 wird näher auf den Vergleich der M₂ von Reh und Rothirsch eingegangen) beginnen die Bildung der Zahnhartsubstanzen zu unterschiedlichen Zeiten der Ontogenese. Die zeitliche Abfolge der Dentition der untersuchten Arten wird in Kapitel 3 gesondert betrachtet.

2.1. Frühe Odontogenese

Die Odontogenese beginnt früh im Verlauf der Embryonalentwicklung, z.B. beim Menschen ab dem 28. Entwicklungstag, oder beim Reh 4-6 Wochen post implantationem (Kierdorf H 1988, Kierdorf H und U 1989). Reh, Rothirsch und Wildschwein besitzen zum Zeitpunkt der Geburt eine vollständige lakteale Dentition (Incisivi, Canini und Prämolaren des Milchgebisses), sowie Anteile der permanenten Dentition (M₁; von Raesfeld et al. 2003b, Briedermann 1990).

Grundlage der Odontogenese sind zwei durchgängige, epitheliale Bänder in der Mundhöhle, die jeweils annähernd hufeisenförmig die Lage der späteren Ober- bzw. Unterkiefer beschreiben. Jedes dieser primären Epithelbänder generiert durch Proliferationen der Basalzellen zwei Untereinheiten: die zuerst gebildete generelle Zahnleiste und die Vestibularleiste. Die Zellen der Vestibularleiste gehen später durch Apoptose zugrunde. Auf diese Weise bildet sich der Mundvorhof (Vestibulum oris) aus.

Im anterioren Bereich der Zahnleiste führen weitere lokale Proliferationen zur Bildung einer Serie von epithelialen Auswüchsen in das Ektomesenchym. Deren Lokalisierung stimmten mit den Positionen der späteren Milchzähne überein. Ektomesenchymale Zellen akkumulieren um diese knospenförmigen Auswüchse (Knospenstadium). Das anschließende Kappenstadium entwickelt sich durch weitere differenzierende Zellteilungen in der Zahnknospe. Zentral weist die Zahnknospe eine Einstülpung auf, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung durch umwachsen der Ränder des Zahnkeims zum Glockenstadium vertieft. In der Vertiefung aggregieren Zellen des Ektomesenchym, aus denen sich später die Odontoblasten und weitere Anteile des Pulpagewebes differenzieren. Auf der Außenseite des Zahnkeims entwickeln sich Zellen des Zahnsäckchen, die die Zahnanlage umhüllen und in weiteren Verlauf der Entwicklung Anteile des Zahnhalteapparates hervorbringen.

Im Glockenstadium erfährt die Zahnkrone ihre endgültige Histo- und Morphodifferenzierung. Das Schmelzorgan ist geteilt in einen inneren und äußeren Anteil, welche in einer zervikalen Schlinge ineinander übergehen. Zwischen den beiden Anteilen liegt ein Stratum retikulare. An der zervikalen Schlinge ist rege Zellteilung zu beobachten, bis die endgültige Kronenform erreicht ist und die Zellen sich an der Wurzelbildung beteiligen. Zwischen dem inneren Schmelzepithel und dem Stratum retikulare differenzieren einige Zellen zu einer Schicht, die Stratum intermedium genannt wird. Die Zellen dieser Schicht weisen eine hohe Aktivität von alkalischer Phosphatase auf, einem wichtigen Enzym der Schmelzbildung. Die Differenzierung der Odontoblasten wird im Abschnitt „Dentinogenese“ genauer betrachtet.

Am jeweiligen distalen Ende der Zahnleiste verlängert sich diese und es entstehen in gleicher Weise Anlagen für die Zuwachszähne des Dauergebisses. Ontogenetisch werden die Zuwachszähne der laktealen Zahngeneration zugerechnet, während sie funktionell mit der zweiten Zahngeneration, also den Ersatzzähnen (permanente Dentition) auftreten. Die Anlagen der permanenten Dentition entstehen lingual bzw. palatinal der Milchzahnanlagen als Aussprossung der generellen Zahnleiste, die sich mit dem Erreichen des Glockenstadiums der Milchzahnanlagen auflöst. Die Keime der Ersatzzähne entwickeln sich jeweils an der entsprechenden Ersatzzahnleiste.

2.2. Dentinogenese

Der Großteil eines Zahnes der plazentalen Säuger besteht aus Dentin, welches auch Zahnbein genannt wird. Reifes Dentin besteht zu ca. 70 Gewichtsprozenten aus anorganischem Mineral, 20 Gewichtsprozent organischem Material und 10 Gewichtsprozent Wasser (Nanci 2008). Die genauen Angaben schwanken gering zwischen verschiedenen Autoren (z.B. Hillson 2005: 72 Gewichtsprozent, Arnold 2006: 70 Gewichtsprozent; Schroeder 2000: 70 Gewichtsprozent).

In die organische Grundsubstanz des Dentins wird das Mineral Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) eingelagert, ein Produkt einer komplexen Biomineralisation. Die Hydroxylgruppe des Apatits kann z.B. durch F^- substituiert werden. Das Mineral liegt in kleinen Plättchen vor, die wesentlich kleiner sind als Schmelzprismen. Ihre Größe beträgt zwischen 20 und 200 nm im Durchmesser (Hillson 2005). Die organische Phase des Dentins besteht zu ca. 90 Gewichtsprozent aus Kollagen (hauptsächlich Typ I und wenig Typ III und V). Nichtkollagene Matrixproteine (z.B. Dentin Phosphoprotein) füllen die Lücken zwischen den Kollagenfibrillen. Entlang der Dentinkanälchen sind die nichtkollagenen Matrixproteine besonders akkumuliert.

Fast die gesamte Pulpa (bis auf die Öffnung des zervikalen Wurzelkanal) ist an ihrer Innenfläche von Dentin umgeben, und damit maßgeblich für die Formgebung des Zahnes verantwortlich. Die Oberfläche des Dentins ist apikal von Zement und koronal von Schmelz überzogen, welche an der Schmelz-Zement-Grenze in verschiedener Weise aufeinander treffen. Der koronale Überzug mit Schmelz kann, je nach Funktion und Art des Zahnes, vollständig oder auch begrenzt auf Teile der Krone sein. Artspezifische Unterschiede in der Ausformung des Schmelzüberzuges sind groß (siehe Kapitel 3).

In der Regel bleibt Dentin während des gesamten Funktionszeitraumes eines Zahnes vital. Im Gegensatz zum Schmelz, dessen Bildungszellen (Ameloblasten) nach der Amelogenese zugrunde gehen und keine zellulären Bestandteile im Mineral zurücklassen, zieht sich ein apikaler Fortsatz des dentinbildenden Odontoblasten in einem Dentinkanälchen durch das reife Dentin. Der Odontoblast mauert sich nicht wie Osteoblasten oder Zementoblasten in seiner sezernierten Matrix ein, sondern der Zellkörper bleibt an der Grenze des Prädentins zur Pulpa erhalten. Nur der Odontoblastenfortsatz, der von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Pulpa reicht, zieht durch das mineralisierte Dentin. Dentin nimmt damit im Vergleich zu den anderen Hartsubstanzen eine Sonderstellung ein.

Dentin wird von den Odontoblasten gebildet, die sich im Glockenstadium aus dem Ektomesenchym der Zahnpapille differenzieren. Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle aus dem Schmelzepithel initiieren und steuern die Differenzierung der Odontoblasten. Die Zellen der Zahnpapille sind vor der Differenzierung kubisch mit zentralständigem Kern. Zu Beginn der Differenzierung werden diese Zellen vom inneren Schmelzepithel durch eine azelluläre, Kollagen-haltige Zone separiert. Die ektomesenchymalen Zellen entlang der azellulären Zone beginnen rapide zu wachsen und differenzieren sich zu hochprismatischen, stark polarisierten Präodontoblasten. Chronologisch folgt dieser Prozess dem Polarisationswechsel der Zellen des inneren Schmelzepithels, welches den Beginn der Amelogenese darstellt. Veränderungen im Schmelz und Dentin, dessen Bildungsstörung auf den gleichen zeitlichen Ursprung zurückzuführen, sind daher im histologischen Bild entlang der Schmelz-Dentin-Grenze leicht zueinander versetzt. Veränderungen des Dentins haben einen weiter zervikal gelegenen Ursprung entlang der Schmelz-Dentin-Grenze.

Auf die Differenzierung der Odontoblasten folgt die Sekretion der organischen Matrix des Dentins. Die erste sezernierte Schicht besteht aus Kollagen Typ III Fasern mit großem Durchmesser. Diese Fasern, die auch *von Korff's Fasern* genannt werden, entspringen am Apex und der Odontoblasten und inserieren in der strukturlosen Grundsubstanz unter dem Schmelzepithel. Mit zunehmendem Wachstum der Odontoblasten werden vermehrt Kollagenfasern vom Typ I sezerniert, welche parallel zur späteren Schmelz-Dentin-Grenze verlaufen. Somit ist die erste Schicht des Dentins, das sog. Manteldentin gebildet.

Einhergehend mit der Deposition von Kollagen vollzieht sich die weitere Differenzierung der Odontoblasten. Die dem inneren Schmelzepithel zugewandte Seite des Odontoblasten beginnt verzweigte Fortsätze auszubilden, die in die formende extrazelluläre Matrix einstrahlen und gelegentlich die Basallamina penetrieren. Später erscheinen diese Fortsätze als sog. Schmelzspindeln im Schmelz. Anschließend wird der eigentliche Odontoblastenfortsatz gebildet, der in der sich formenden Dentinmatrix hinterlassen wird. Neben den Fortsätzen werden membrangebundene Matrixvesikel sezerniert, in denen erste einzelne Kristalle der mineralischen Phase enthalten sind. Die Ausschleusung der Vesikel an die exakte Stelle ist gebunden an Phospholipide und Glykoproteine der Vesikelmembran. An der Phosphorylierung der Phospholipide und Glykoproteine des Dentins im Anschluss an die Translation ist die Casein Kinase II beteiligt. Alkalische

Phosphatase hat das Potenzial, diese Proteine wieder zu dephosphorylieren und ist in der Lage zu verhindern, dass frühzeitig die extrazelluläre Matrix phosphoryliert wird, welches eine temporäre Inhibierung der Mineralisation darstellt (Suzuki et al 1998). Temporäre Inhibitoren der Mineralisation wie z.B. Pyrophosphatase werden von der Alkalischen Phosphatase aufgeschlossen. Dieser enzymatische Aufschluss stellt organischen Phosphor für das Kristallwachstum bereit (Van den Bos und Beertsen, 1994).

Die Kristalle in den Matrixvesikeln aus den Odontoblasten wachsen rapide an bis die Vesikelmembran reißt. Diese Kristalle, ohne die Vesikelmembran, verbleiben als Mineralisationskeime angelagert am Kollagen und wachsen weiter. Die benötigten Mineralien für das Wachstum dieser sog. Kalkospheriten liegen in der interzellulären Matrix in Lösung vor. Mit zunehmendem Wachstum fusionieren die Kalkospheriten und füllen den kompletten Zwischenraum der organischen Matrix auf. Aus der Sezernierung einer organischen Prädentinmatrix und der anschließenden Mineralisierung durch Einlagerung von Kalkospheriten entsteht eine 15-20 µm dicke Schicht koronalem Manteldentins. Die Bildung des primären Dentins folgt in gleicher Weise.

2.3. Struktur des Dentins unter Berücksichtigung der Nomenklatur

Aus den oben genannten Prozessen ergibt sich eine für das Dentin spezifische Mikromorphologie, die sich sowohl im histologischen als auch im Elektronenmikroskopischen Bild im Rückstreumodus (BSE) eines bucco-lingualen Schliffes darstellen lassen. Im lichtmikroskopischen Bild eines ungefärbten Zahnschliffs erscheint das Dentin als inhomogenes Kompositmaterial, das von Dentinkanälchen durchzogen ist. Diese reichen von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Pulpa. Im koronalen Primärdentin beschreiben die Dentinkanälchen eine S-förmige Primärkrümmung, die im zervikalen Dentin in eine Bogenform übergeht (Abb. 1a). Der Übergang zum sekundären Dentin ist durch einen geraden Verlauf der Kanälchen in Richtung Pulpa gekennzeichnet. Verzweigungen der Dentinkanälchen als Verbindungen der Odontoblastenfortsätze sind in regelmäßigen Abständen zu beobachten (Abb. 1b). Die eigentlichen Odontoblasten (-fortsätze) sind in einem histologischen Dünnschliff eines nicht fixierten Zahnes aufgrund der Präparation nicht mehr erhalten. Im BSE-Bild erscheint das Dentin als homogene Masse mit angeschnittenen Dentinkanälchen. Die Kanälchen sind je nach Anschnitt rund bis

oval. Das BSE-Bild gibt Auskunft über den Grad der Mineralisation; je heller der Grauwert, desto stärker mineralisiert ist das Gewebe (vgl. Schmelz mit Dentin, Abb. 1c). Im primären Dentin sind zwei Dentinformen zu unterscheiden: Das weniger stark mineralisierte intertubuläre Dentin, welches den Großteil des Gewebes ausmacht und das stärker mineralisierte peritubuläre Dentin, welches sich auf den Rand des Dentinkanälchens beschränkt.

Optisch lässt sich primäres und sekundäres Dentin aufgrund der Orientierung der Odontoblastenfortsätze differenzieren (s.o.). Primäres Dentin weist eine primäre Krümmung auf, sekundäres Dentin verläuft gerade und im gleichbleibenden Winkel auf Richtung Pulpa (Abb. 1a). Ein weiterer Unterschied zwischen primärem und sekundärem Dentin ist die Wachstumsgeschwindigkeit. Primäres Dentin, welches den größeren Teil des Gewebes ausmacht, wächst schneller (ca. 4µm pro Tag, Homo), als sekundäres Dentin (genaue Zuwachsraten sind nicht bekannt). Primäres Dentin wächst während der Entwicklung eines Zahnes bis zur Fertigstellung der Wurzel und damit einhergehender Okklusionsstellung des Zahnes, sekundäres Dentin wächst sehr langsam im Anschluss an die Wurzelbildung, wird aber von der gleichen Odontoblastenpopulation gebildet. Diese Population wird stetig reduziert, da das Pulpacavum mit fortschreitendem Wachstum des Dentins immer enger wird.

Des Weiteren wird tertiäres Dentin unterschieden, dessen Bildung als Reaktion auf Störeinflüsse gesehen werden kann. Es tritt immer dort auf, wo das reguläre Gefüge des Zahns gestört ist (Karies, Frakturen o.ä.). Die Nomenklatur dieser drei Dentintypen (primäres, sekundäres und tertiäres Dentin) kann in der Literatur sehr stark variieren. Eine gute Zusammenfassung der verschiedenen Nomenklaturen wurde von Kuttler bereits 1959 erstellt und ist in Anlehnung an Glickmann et al. (2002) in der vorliegenden Arbeit verwendet worden (s.o.).

Aufgrund des inkrementellen Wachstums des Dentins ergeben sich linienförmige Muster im Gewebe, welche verschiedene Ursachen haben. Diese Linien können durch pathologische Einflüsse verstärkt werden. Die Nomenklatur der verschiedenen Linien in der Literatur ist uneinheitlich und wird im Folgenden näher betrachtet.

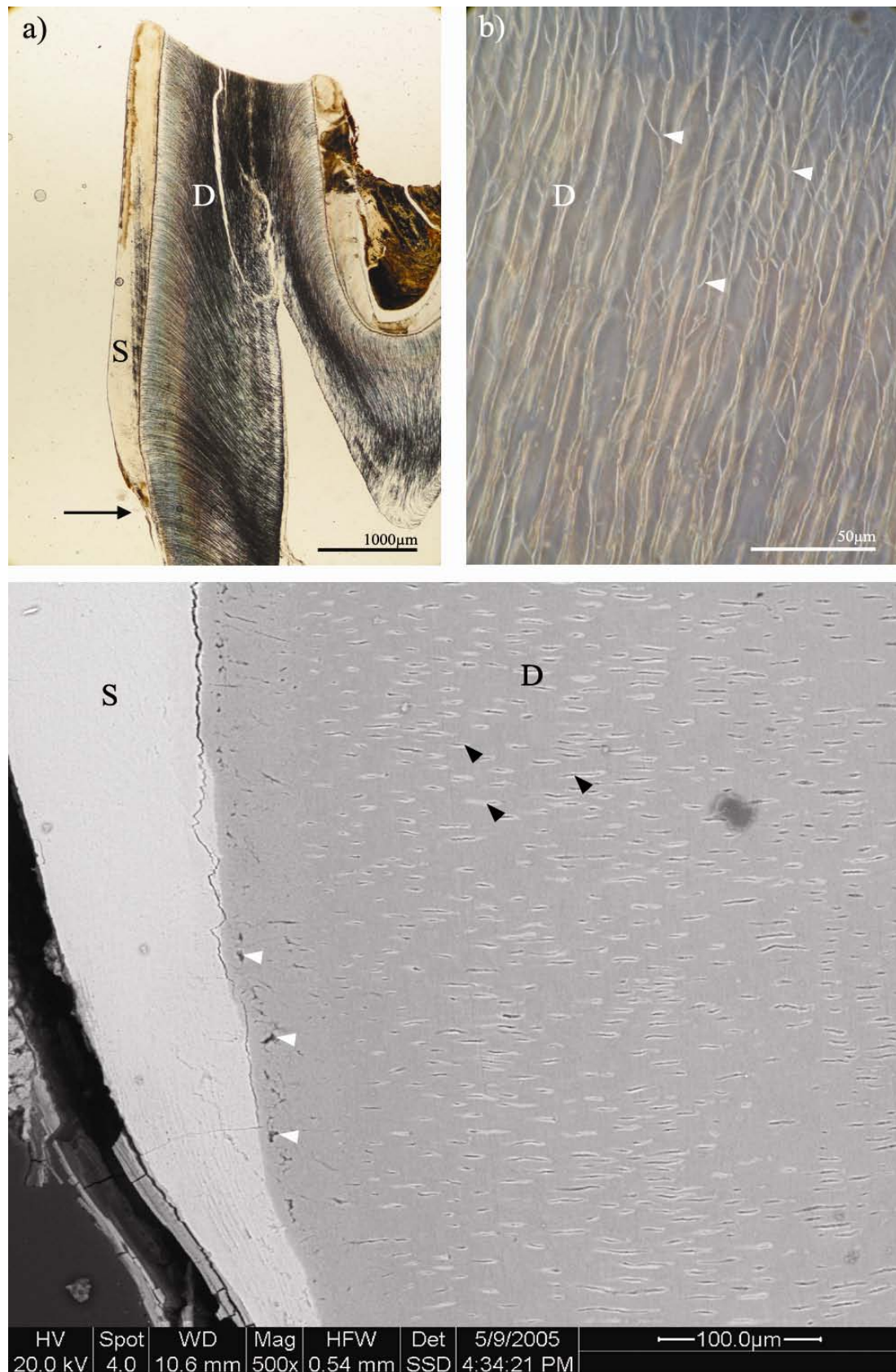


Abb. 1a) Übersicht über den lingualen Anteil eines 4. Prämolaren, Durchlicht. Die Dentinkanälchen verlaufen S- bis bogenförmig. **b)** Verzweigungen der Dentinkanälchen (▷) Phasenkontrast.. **c)** Wie **a)** im REM (BSE Modus). Das peritubuläre Dentin (▶) ist stärker mineralisiert, als das Intertubuläre. Geringgradige Ausprägung von IGD an der Schmelz-Dentin-Grenze (▷). **D:** Dentin, **S:** Schmelz, →:Schmelz-Zement-Grenze

Short Period Incremental Markings (SPI):

Die oben beschriebene Deposition des Dentins erfolgt nicht gleichmäßig sondern circadian rhythmisch und entspricht damit der Prismenquerstreifung im Schmelz. Alternierend treten Phasen unterschiedlich starker Bildungsleistung auf. Perioden schwacher Bildungsleistung sind durch inkrementelle Linien im Dentin abgebildet. Die erste Beschreibung dieser sehr schmalen, senkrecht zu den Dentinkanälchen verlaufenden Linien im Dentin geht auf von Ebner (1902) zurück. Im transversalen Querschnitt liegen diese Linien konzentrisch um die Pulpa, im bucco-lingualen Schnitt beschreiben sie die Form der Pulpa. SPI's sind sehr unscheinbar und im nicht-entkalkten histologischen Dünnschliff nicht immer sichtbar. Die Distanz zwischen den Linien geht zurück auf die zyklischen Veränderungen in der Zuwachsrate der Mineralisation (Bradford, 1967; Frank und Nalbandian, 1989; Piesco, 1994; Dean and Scandrett, 1996; Dean, 2006). Die vorliegenden Befunde zu den Ungulaten (s.u.) stützen die Theorie der periodischen Schwankung der Mineralisation. Mikroradiographien zeigen ein alternierendes Muster von schwächer und stärker mineralisierten Linien. Stärker mineralisierte Linien entsprechen Phasen geringer Aktivität, schwächer mineralisierte Linien entsprechen Phasen der stärkeren Aktivität der Odontoblasten.

Die Nomenklatur der SPI's variiert: "Anlagerungsschicht" (3-8 μm , Schroeder 2000), „Daily incremental lines = imbrications lines of von Ebner“ (Avery 1994), Von Ebner lines (4-8 μm Hillson 1986; 2-5 μm , Hillson 1996) oder Ebner's Lines (MPI Leipzig 2005) sind bekannte Bezeichnungen der inkrementellen Linien in menschlichen Zähne. Miles (1967) bezieht sich auf entkalkte Schliffe; er nennt die inkrementellen Linien „Arcade layers“ und bezieht sich auf die Orientierung der Matrixstruktur. In verschiedenen Ausgaben des Lehrbuches „Oral Histology“ (Ten Cate 1985; Nanci 2003, 2008) ändert sich die Terminologie von "incremental lines of von Ebner" (c. 6 μm -crown; c. 3.5 μm -root; Ten Cate 1985) zu "Daily incremental lines" (4 μm ; Nanci 2003, 2008). Dean (1998) führte den Begriff "short period (von Ebner's) lines" ein. Er stellt fest, dass die Distanz der Linien in verschiedenen Bereichen des menschlichen Zahnes unterschiedlich ist (Dean et al. 1993). Er untermauert seine Feststellung durch Untersuchung einer weiteren Art (Makaken, Dean 1993). Seine Ergebnisse geben haltbare Erklärungen für die große Variation der verschiedenen beschriebenen Distanzen zwischen den inkrementellen Linien.

Verschiedene Zuwachsraten in verschiedenen Zonen des Zahnes erzeugen die große Streuung der Distanzen zwischen SPI's.

In der vorliegenden Arbeit werden die Zähne von Ungulaten untersucht. Diurnale Periodizität des inkrementellen Zuwachses für Schweineezähne wurde von Yilmaz (1977) experimentell durch Markierungen mit Fluorochromen demonstriert. Inuma et al (2002, 2004) beschreiben die kurzperiodischen inkrementellen Linien für Sikahirsche. Die gemessenen Distanzen der inkrementellen Linien von Schweinen und Sikahirschen variieren in gleichem Rahmen, wie auch für menschliche Zähne (s.o.). Als Nomenklatur wird in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Abwandlung der von Dean (1998) bevorzugt: Short Period Incremental Markings (SPI). SPI's sind für alle drei Arten in dieser Arbeit nachgewiesen. Im histologischen Bild sind die senkrecht zu den Dentinkanälchen verlaufenden Linien zu erkennen (**Abb. 2a**), in der Mikroradiographie tritt auch der alternierend höhere und niedrigere Mineralisationsgrad der einzelnen Linien deutlich hervor (**Abb. 2b**). Jeweils eine helle und eine dunkle Linie gemeinsam entsprechen dem von Yilmaz beschriebenen circadianem Rhythmus.

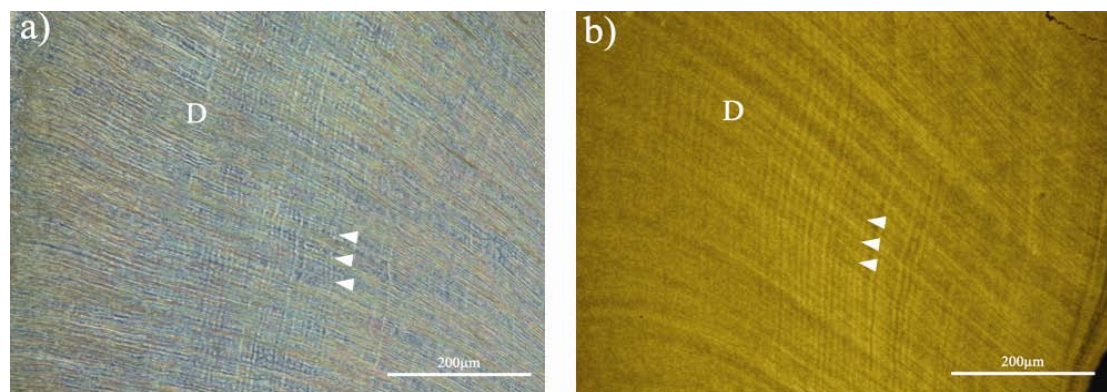


Abb. 2a) Mikrofotographie des Dentins im Phasenkontrast (4. Prämolare, Reh). SPI's (▷) verlaufen senkrecht zu den Dentinkanälchen. **b)** Mikroradiographie von **a)** alternierender Mineralisationsgrad der SPI's (▷). **D:** Dentin

Long Period Incremental Markings (LPI): Langperiodische Inkrementelle Linien gehen auf einen Rhythmus zurück, der den SPI's überlagert ist. Sie sind äquivalent zu den Retziuslinien im Schmelz und sind prominenter als SPI's. Gemessen an der Zahl der SPI's ergibt sich ein Rhythmus von 5-10 Tagen zwischen der Deposition zweier solcher Linien im menschlichen Zahn, entsprechend der Schwankung der Rhythmizität der Retziuslinien. Als Ursprung wird ein periodischer Wechsel in der Richtung der Deposition der Kollagenfasern angenommen (Nanci 2008). Jones und Boyde (1984) und Dean und Scandrett (1995) gehen von zyklischen Schwankungen

in der Deposition von Kollagen und Grundsubstanz aus, die durch entsprechende Linien repräsentiert wird. Wie eigene Mikroradiographien zeigen, sind diese Linien im Vergleich zum umliegenden Dentin leicht untermineralisiert. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die periodische Schwankung der Deposition der Grundsubstanz Einfluss auf den Grad der Mineralisation im Bereich einer LPI hat.

In der vorliegenden Literatur werden LPI's verschiedenen Autoren zugeordnet, die Nomenklatur geht dabei stark durcheinander. Schroeder (2000) und Nanci (2003, 2008) sprechen sie von Ebner zu ("Ebnersche Linien, 20 µm; 5 day increment = incremental lines of von Ebner, 20 µm). Ihre Beobachtungen sind unstrittig. Avery (1994) nennt die Linien "Contour lines of Owen" und ordnet sie damit Owen zu. Hillson (1986) erwähnt die Linien nicht, aber der unaufmerksame Leser könnte geneigt sein, sie mit seiner Beschreibung der „Contour lines of Owen“ zu verwechseln. Owensche Konturlinien werden im Laufe dieses Kapitels gesondert in einem eigenen Absatz besprochen. Fakt ist, das Owen "*contour lines of dentine*" erwähnt, diese aber nicht weiter erklärt. Er separiert sie aber von einer sekundären Krümmung der Dentinkanälchen, welche auch den Eindruck von Linien erzeugen können (Owen 1845, p. 460/Plate 122). Miles (1967) beschreibt LPI's als normale inkrementelle Wachstumslinien.

1996 geht Hillson dazu über diese Linien mit einer Zwischendistanz von 15 – 30 µm Andresen Linien zu nennen, 2005 wird diese Nomenklatur auch vom MPI Leipzig verwendet. Die diskutierten inkrementellen Linien wurden als erstes von Andresen (1898) beschrieben, der ein regelmäßiges Muster prominenter dunkler Linien kombiniert mit feineren Schichten und entsprechend schmalen Linien beobachtet. Andresen schreibt diese Linien von Ebners Beobachtungen zu, unglücklicherweise gibt er keine Angaben über den Abstand der beobachteten Linien. 1996 bezieht Hillson in seine Bezeichnung auch Erkenntnisse von Kawasaki et al. (1975) und Dean (1993, 1998), Dean et al. (1993), Dean und Scandrett (1995, 1996), mit ein. Dean et al. führen einen funktionellen Term für die beschriebenen Linien ein, der auch in der vorliegenden Arbeit bevorzugt verwendet wird: Long Period Incremental Markings. In seiner Neuauflage von 2005 des Buches „Teeth“ übernimmt Hillson diese Nomenklatur explizit aus den Arbeiten von Dean. In ihrer Arbeit von 1996 stellen Dean und Scandrett den Zusammenhang zwischen Retziuslinien im Schmelz und LPI's her. Sie nennen sie eine „...Reflektion der Linien des Schmelzes im Dentin...“. Die Beobachtung, das korrespondierende Retziuslinien im Schmelz und

LPI's im Dentin an der Schmelz-Dentin-Grenze aufeinander treffen stimmt mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen überein (**Abb. 3**). Da die Amelogenese der Dentinogenese zeitlich nachgeschaltet ist, treffen beide Linien leicht versetzt aufeinander, wobei die Linie im Dentin weiter zervikal liegt. Auch die Anzahl der Schmelzprismen zwischen zwei Retziuslinien entspricht der Anzahl von SPI's im Dentin.

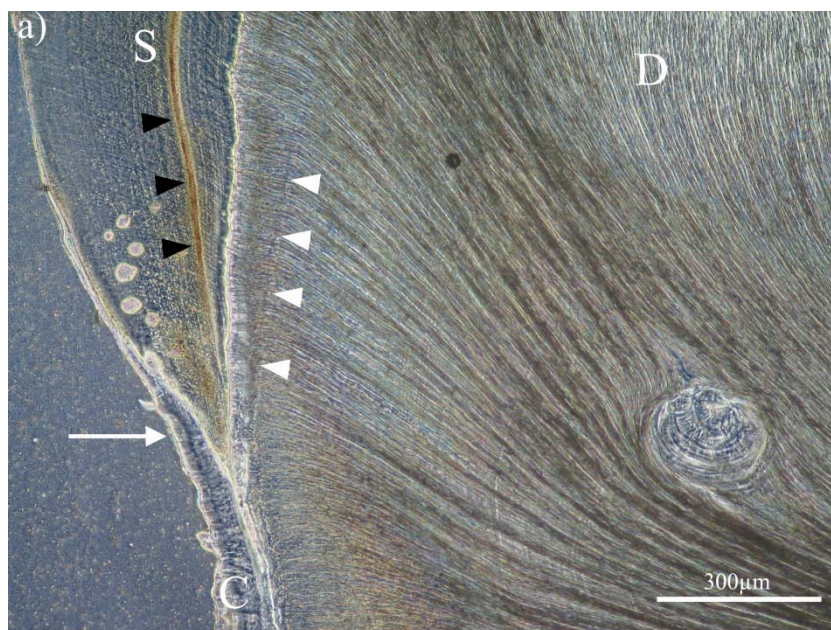


Abb. 3: Mikrofotographie des Dentins im Phasenkontrast (3. Molar, Reh). LPI im Dentin (\triangleright) und korrespondierende Retziuslinie im Schmelz (\blacktriangleright) treffen versetzt an der Schmelz-Dentin-Grenze aufeinander. **C:** Zement, **D:** Dentin, **S:** Schmelz, **Pfeil:** Schmelz-Zement-Grenze.

Accentuated Long Period Incremental Markings (ALPI): Mit einer Störung der Mineralisation des Dentins geht grundsätzlich eine Akzentuierung der LPI's einher. Das Resultat ist eine Hypomineralisierung, die sich entlang von LPI's manifestiert (Abb. 4a+b). Die Hypomineralisierung konnte mit eigenen Ergebnissen der Mikroradiographie belegt werden (Abb. 4c). Diese Akzentuierungen sind Reaktionen auf experimentell applizierte Substanzen wie z.B. Bleiacetat (Appleton 1991, 1992), Strontiumchlorid (Appleton 1993, 1995) Tetrazyklin (Dean und Scandrett 1995; 1996), Natriumfluorid (Appleton 1988, 1992, 1994, 1995; Milan 1999; Yaeger 1966), oder Fluoride aus Kraftwerkemissionen (Appleton et al. 2000). Die Auswirkung von Fluoriden aus Kraftwerkemissionen bei Artiodactyla wird in den vorgelegten eigenen Arbeiten genauer betrachtet. Weitere Gründe für das Auftreten von ALPI's können (experimentell erzeugte) Mangelerkrankungen von Vitamin A oder D sein (Mellanby 1927), bzw. Folge einer Ektomie der Thyroidea (Spreter v. Kreudenstein 1939). Generell ist festzuhalten, dass eine Vielzahl von Störeinflüssen zu Mineralisationsstörungen im Dentin führen kann. Eisenman und Yaeger (1969)

prüfen z.B. parallel 39 Ionen auf ihre Auswirkungen auf das Dentin und den Schmelz von Ratten.

In der Literatur werden häufig pathologisch akzentuierte Linien unter den Sammelbegriff „Owensche Konturlinien (Contour lines of Owen)“ zusammengefasst (Hillson 1996, Schroeder 2000, Ten Cate 1985, Nanci 2003, 2008), was nicht ganz korrekt ist. Die genaue Beschreibung von Owens Beobachtungen erfolgt in einem gesonderten Abschnitt. Zumindest Nanci (2008) erwähnt, dass der Begriff „Contour lines of Owen“ auch für sekundäre Kurvaturen der Dentinkanälchen verwendet wird. Hillson (2005) weist in seiner späteren Arbeit auf diesen Missstand hin. Weitere Beschreibungen kommen von Miles (1967; “contour lines”), Avery (1994) und in einer früheren Veröffentlichung von Hillson (1986) ist die Rede von „exaggerated -“ oder „accentuated contour lines“, welche assoziiert mit Interglobulardentin (IGD; siehe unten) auftreten. Der systemische Zusammenhang von ALPI's und IGD wird deutlich bei der Betrachtung einer untermineralisierten ehemaligen Dentinfront: entlang einer solchen können sowohl IGD als auch LPI nebeneinander auftreten. Dieser Zusammenhang wird nachfolgend genauer beschrieben und erläutert. Dean und Scandrett (1995, 1996) führen den Begriff “Accentuated Long Period Incremental Markings (ALPI)” in ihren Arbeiten zu den Verhältnissen von ALPI's im Dentin und Akzentuierten Retziuslinien im Schmelz ein. Die akzentuierten inkrementellen Linien im menschlichen Zahn wurden durch Gabe von hohen Dosen Tetrazyklin im Alter zwischen 1 und 12 Jahren erzeugt. Der Ursprung von ALPI und akzentuierten Retziuslinien liegt an der Schmelz-Dentin-Grenze im gleichen Bereich. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden der eigenen Arbeiten. Dean und Scandrett betonen den inkrementellen Charakter dieser Akzentuierungen und benutzten eine funktionelle Nomenklatur. Die von ihnen eingeführte Nomenklatur wird in dieser Arbeit übernommen.

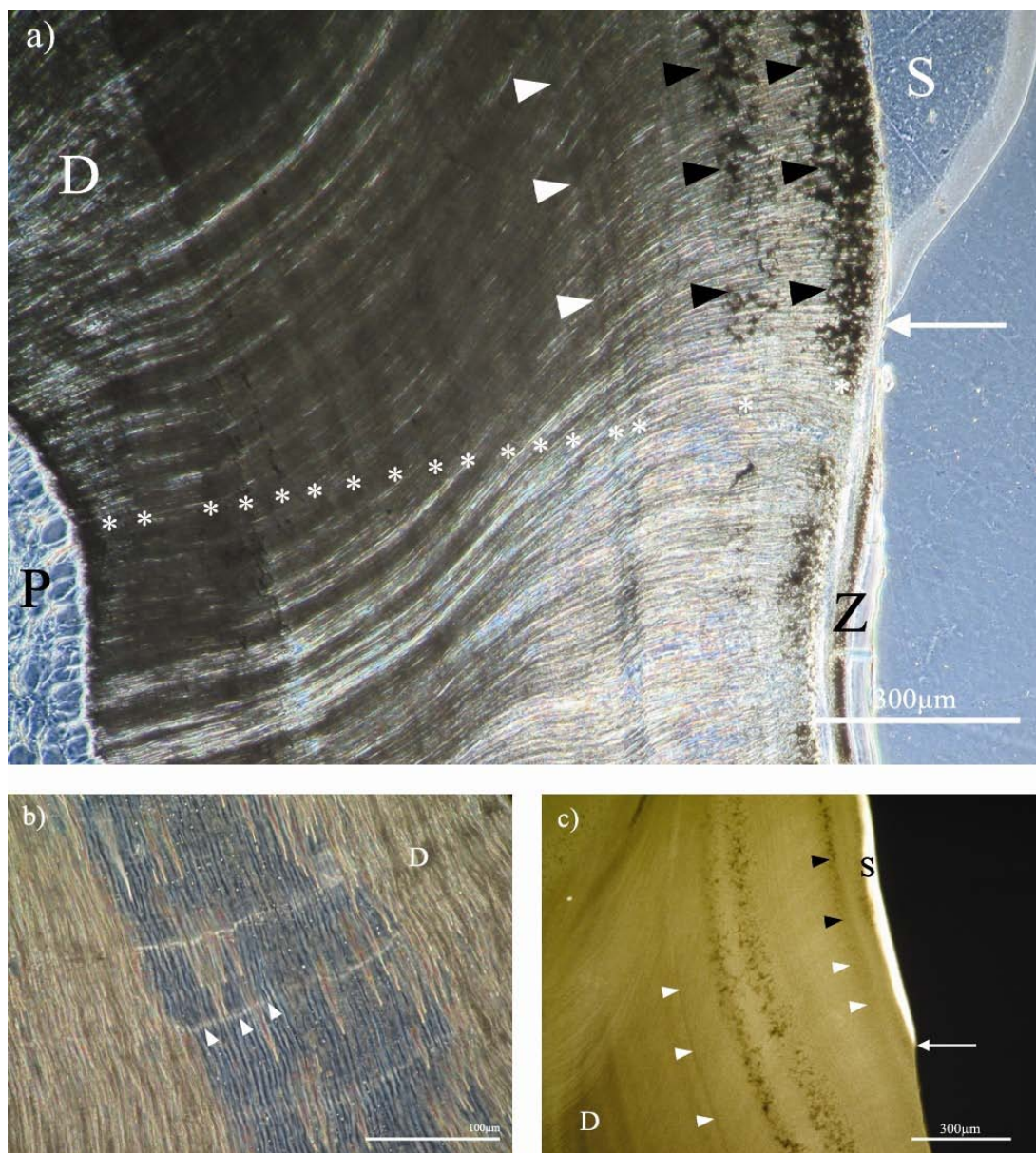


Abb. 4: a) Mikrofotographie des Dentins im Phasenkontrast (4. Prämolare, Reh). ALPI's (▷) im chronisch fluorid-belasteten Dentin verlaufen senkrecht zu den Dentinkanälchen, insgesamt 17 (*) auf einer Strecke von ca. 1200µm. Stärker betroffene Stellen zeigen IGD (◀). b) Mikrofotographie des Dentins im Phasenkontrast (4. Prämolare). ALPI's (▷) in dünner geschliffenen Bereichen treten deutlich hervor. c) Mikroradiographie von a). ALPI's (▷) sind deutlich untermineralisiert. Beachte den Übergang von ALPI's (▷) zu IGD (◀). D: Dentin, P: Pulpa, S: Schmelz, Z: Zement Pfeil: Schmelz-Zement-Grenze.

Owensche Konturlinien: Die von Owen bereits 1845 (Plate 122 A) beschriebenen Konturlinien sind nicht inkrementeller Art sondern resultieren aus einer abweichenden Verlaufsrichtung der Odontoblastenfortsätze. Owen beschreibt eine „secondary undulation“, also eine sekundäre Wellenform der Odontoblastenfortsätze begrenzt auf einen eng umschriebenen Bereich im Dentin. Die „Wellen“ haben dabei im Vergleich zur primären Krümmung der Odontoblastenfortsätze eine sehr hohe Frequenz. Diese sekundäre Krümmung tritt auch in den eigenen untersuchten Proben

auf (Abb. 5), eine Korrelation zur Fluorose ist nicht eindeutig nachzuweisen. Owen war sich der Dreiteilung der Dentinogenese (Differenzierung und Wachstum der Odontoblasten, Sekretion der organischen Matrix und anschließender Mineralisation) nicht bewusst. Erst Bradford (1967) nimmt an, dass die sekundäre Kurvatur sich aus der Verlangsamung oder dem totalen Stopp der Matrixsekretion ergibt. Die Odontoblasten wachsen ohne ein stabiles „Matrixgerüst“ weiter, was zu einer Richtungsänderung führen könnte. Zu diesem Zeitpunkt ist die Mineralisierung an entsprechender Stelle noch im Rückstand und kann keinen Einfluss auf die Ausrichtung der Odontoblasten haben. Bradford (1967) beschreibt eine sekundäre Kurvatur, die wie ein Korkenzieher geformt ist.

Die eigene Interpretation der Owenschen Konturlinien stimmt mit der von Bradford (1967) überein. Die Präsenz dieser Linien im Dentin fluorotischer Hirschkähne scheint ein Indikator einer fluorid-induzierten Beeinträchtigung der Matrixformation zu sein. Diese Interpretation wird gestützt durch die Beobachtung von akzentuierten Retziuslinien im Schmelz, welche an der Schmelz-Dentin-Grenze mit Owenschen Konturlinien konvergieren. Simultanes Auftreten gestörter Matrixsekretion der Ameloblasten und Odontoblasten deutet eine simultane Auswirkung auf beide Zelltypen an. Der exakte Mechanismus, der zum parallelen Richtungswechsel der Dentinkanälchen führt, ist nicht bekannt. Die eigene Hypothese ist eine vermutete reduzierte Sekretion der Odontoblasten mit verlangsamter zentripetaler Bewegung. Mechanischer Druck, ausgeübt vom Pulpagewebe, bewirkt daraufhin eine laterale Ablenkung der Bewegungsrichtung der Zellen, welche das beschriebene Muster erzeugt.

Die Bezeichnung Owensche Konturlinien (Contour lines of Owen o.ä.) wird in der Literatur häufig zusammenfassend für sämtliche pathologischen Linien im Dentin verwendet, ohne genauer zu differenzieren (Schmidt und Keil 1985; Schroeder 2000, Ten Cate 1985, Nanci 2003, 2008). Hillson (1986) erwähnt Owensche Konturlinien in seinem Lehrbuch „Teeth“. Später (Hillson 1996) moniert er den Umstand, dass diese Nomenklatur häufig für verschiedene Strukturen verwendet wird, bis er 2005 den Begriff für die beschriebene sekundäre Kurvatur verwendet. Gemäß Bradford (1967) soll in der vorliegenden Arbeit ein technischer Term verwendet werden, um Verwechslungen auszuschließen: Sekundäre Kurvatur der Dentinkanälchen.

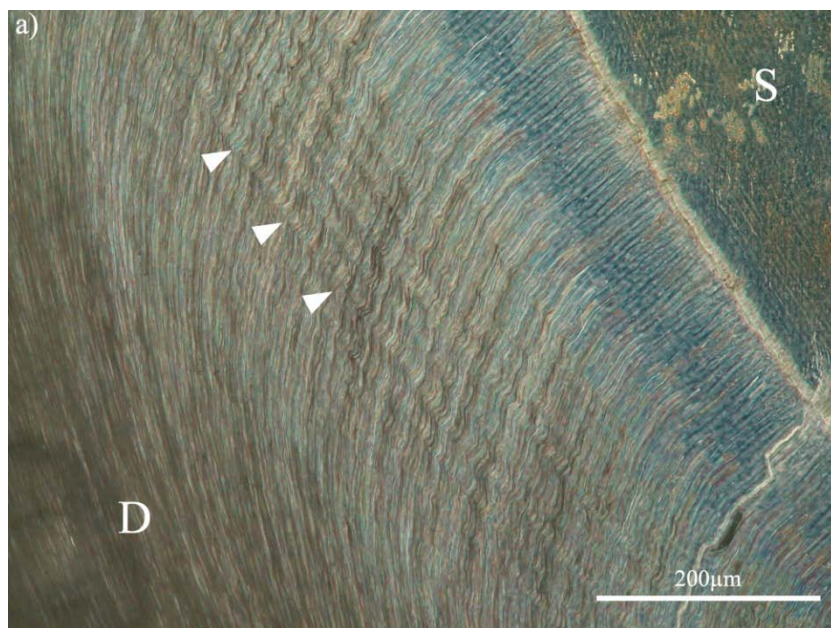


Abb. 5:
Mikrofotographie
des Dentins im
Phasenkontrast (4.
Prämolar,
Rothirsch).
Sekundäre Kurvatur
der Dentinkanälchen
(▷) **D:** Dentin, **S:**
Schmelz

Interglobulardentin (IGD): Interglobulardentin ist das Resultat einer unzureichenden Verschmelzung der in Mineralisierung begriffenen Kalkospheriten. Kalkospheriten sind Mineralisierungskeime, die über Matrixvesikel der Odontoblasten in das Kollagen der organischen Prädentinmatrix eingebaut werden. Diese Keime nehmen durch weitere Mineralisierung an Umfang zu, bis sie mit den benachbarten Kalkospheriten verschmelzen.

Beim Auftreten von Interglobulardentin ist diese Verschmelzung unvollständig. Deutlich wird diese unvollständige Verschmelzung an den eigenen Befunden: Große Mineralisationslücken sind im histologischen Bild des Dentin zu beobachten (Abb. 6a). Diese erscheinen schwarz, da sich im Verlauf der Präparation diese Lücken mit Schleifstaub bzw. Luft füllen. Die Mikroradiographie (Abb. 6b) zeigt, dass Bereiche von IGD komplett strahlendurchlässig (schwarz) und somit nicht mineralisiert sind. Das BSE-Bild (Abb. 6c) bekräftigt diesen Befund, IGD erscheint schwarz im Vergleich zum umliegenden, helleren Mineral. Die höhere Auflösung des BSE-Bildes zeigt zusätzlich die globuläre Struktur der nicht bzw. unvollständig verschmolzenen Kalkospheriten und gibt Hinweise zur Struktur des Interglobulardentins: In den Zwischenräumen der Kalkospheriten ist die organische Dentinmatrix vorhanden, Odontoblastenfortsätze ziehen durch diese Lücken und sind als solche zu erkennen (Abb. 6c).

In geringem Maße tritt Interglobulardentin häufig, fast regulär, im Bereich unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze auf. Im pathologischen Kontext ist Interglobulardentin eine stark ausgeprägte Form der Hypomineralisierung. Während ALPI's als dunkle Linien (im Vergleich zum umgebenden Dentin) erscheinen, gibt es im Interglobulardentin Bereiche, die überhaupt nicht mineralisiert sind. In Bereichen der ALPI's sind die Kalkospheriten vollständig verschmolzen, aber die gesamte Linie ist hypomineralisiert. Im IGD ist die Hypomineralisierung so stark ausgeprägt, dass das globuläre Wachstum der Kalkospheriten komplett stoppt, was zu Bereichen nicht mineralisierter organischer Matrix führt. Beide Formen der Hypomineralisierung können auf den gleichen Störeinfluss zurückgeführt werden, da entlang einer ALPI lokal Interglobulardentin auftreten kann. Interglobulardentin repräsentiert eine stärkere Ausprägung der Mineralisationsstörung im Vergleich zum ALPI.

Die Nomenklatur des Interglobulardentins wird bei den Autoren, die in den vorigen Absätzen zitiert werden, einheitlich verwendet und bedarf keiner umfangreichen Ausführung. Der Term wird ebenso im Glossary of Endodontic Terms von

Glickman et al. (2002) aufgeführt. Lediglich Avery (1994) benutzt den Begriff des Intraglobulären Dentins (Intraglobular Dentin).

Tabelle 1 fasst die zitierten Autoren mit den gebrauchten Nomenklaturen zusammen.

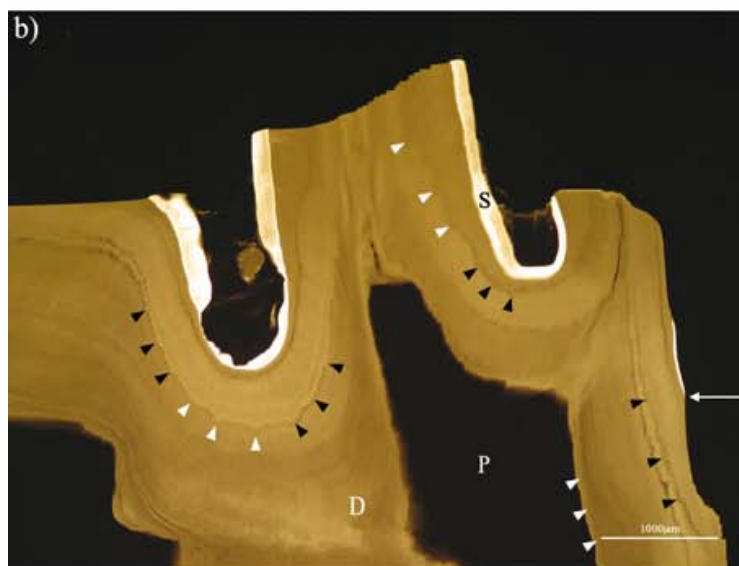
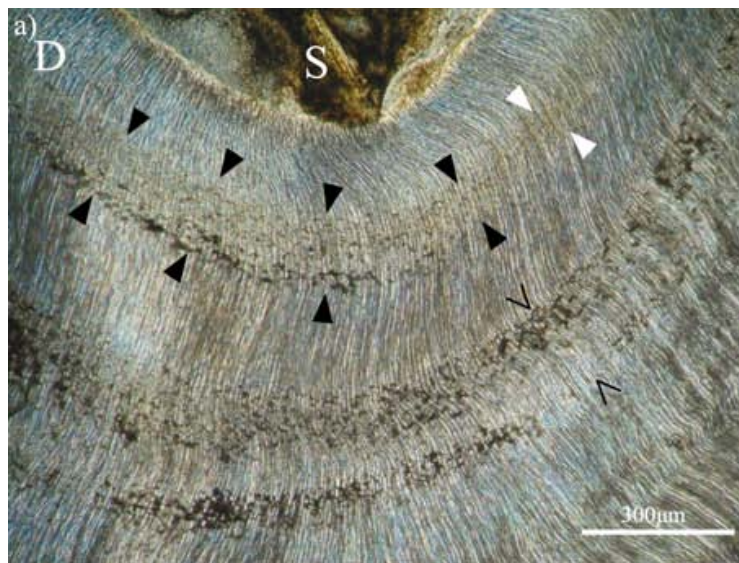


Abb. 6: a) Mikrofotographie des Dentins im Phasenkontrast (4. Prämolare, unterhalb des Infundibulum). ALPI's (▷) setzen sich fort mit IGD (▶). Dentinkanälchen verlaufen durch das IGD (>). b) Mikroradiographie des 4. Prämolaren. IGD (▶) ist wenig mineralisiert, globuläre Struktur der Kalkospheriten ist erkennbar. ALPI's (▷) setzen sich fort mit IGD (▶). c) IGD im REM (BSE Modus). Globuläre Struktur der nicht fusionierten Kalkospheriten ist erkennbar (▷), um diese ist kein Mineral vorhanden. Dentinkanälchen zwischen den nicht fusionierten Kalkospheriten (▶). D: Dentin, P: Pulpa, S: Schmelz, Pfeil: Schmelz-Zement-Grenze.

Quelle	Short period incremental markings; SPI (äquivalent zur Querstreifung im Schmelz)	Long period incremental markings; LPI (äquivalent zu Retziuslinien im Schmelz)	Accentuated long period incremental markings ALPI	Sekundäre Kurvatur der Dentin-Kanälchen
Avery (1994), Oral Development and Histology	Daily incremental lines = imbrications lines of von Ebner	Contour lines of Owen	Exaggerated contour lines	
Dean (1996, 1998)	Short period (von Ebner's) lines	Long period incremental markings		
Hillson (1986), Teeth	Von Ebner's Lines (4-8 μm)		Accentuated contour lines (occurrence of Interglobular dentin)	
Hillson (1996), Dental Anthropology	Von Ebner lines (2-5 μm)	Andresen lines (15-30 μm ; 20 μm)	Contour lines of Owen	
Hillson (2005) Teeth	Short period (von Ebner's) lines	Long period (Andresen) lines		Contour lines of Owen
Miles 1967	Arcade layer (3-4 μm)	Normal incremental lines of growth (25 μm)	Contour lines	Secondary curvature (as of corkscrew form, 20 μm)
MPI Leipzig (2005)	Ebner's lines	Andresen's lines		
Nanci (2003), Ten Cates Oral Histology	Daily incremental lines 4 μm	5 day increment = incremental lines of von Ebner	Contour lines of Owen	
Nanci (2008), Ten Cates Oral Histology	Daily incremental lines 4 μm	5 day increment = incremental lines of von Ebner	Contour lines of Owen	
Schmidt/Keil (1985) Die gesunden und die erkrankten ...			Owensche Konturlinien	
Schroeder (2000), Orale Strukturbio-logie	"Anlagerungsschicht" (3-8 μm)	Ebnersche Linien (20 μm)	Owensche Konturlinien	
Ten Cate (1985), Oral Histology	Incremental lines of von Ebner (c. 6 μm -crown; c. 3.5 μm -root)	Contour lines of Owen	Accentuated contour lines of Owen	
Vorschlag für eigene Nomenklatur	Short period incremental markings SPI (Fig. 2)	Long period incremental markings LPI (Fig. 3)	Accentuated long period incremental marking ALPI (Fig. 4)	Secondary curvature of dentinal tubules (Fig. 5)

Tab. 1: Systematische Zusammenfassung der gebräuchlichsten Nomenklaturen für Linien im Dentin von ausgewählten Autoren

Fazit: Für die Kommunikation in den Wissenschaften ist eine standardisierte Nomenklatur wünschenswert, besonders wenn verschiedene Disziplinen gleiche Themen bearbeiten. Trotzdem gibt es immer wieder Diskrepanzen in Bezug auf die Benennung von Strukturen, was die Kommunikation erschwert. Speziell in der Odontologie treffen verschiedene Disziplinen (Human- und Veterinärmedizin, Zoologie, Histologie) mit verschiedenen Vorstellungen aufeinander, was z.B. auch die Zitierung von wissenschaftlichen Arbeiten erschwert. Andererseits stimulieren diese unterschiedlichen Auffassungen den Dialog und die Diskussion der untersuchten Thematik. Speziell in Bezug auf das Dentin mit seinen regulären und irregulären Linien, welche zum Ende des 19. und Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben wurden, ist Wert darauf gelegt worden, eine Benennung zu Ehren des Erstbeschreibers einzuführen. Die Autoren (Andresen, von Ebner und Owen) hatten keinen Zugang zu modernen präparativen und analytischen Methoden, weshalb ihnen das komplette Verständnis der Dentinogenese nicht zugänglich war (keinesfalls ist davon auszugehen, dass dies heutzutage der Fall ist). Weitere Untersuchungen waren nötig. Die vorliegende Liste der von Autoren, die inkrementelle und pathologische Linien im Dentin untersucht haben, ist in der vorliegenden Arbeit sehr umfangreich, aber bei weitem nicht vollständig.

Speziell am Beispiel der von Hillson verwendeten Nomenklatur zeigt sich, dass die Nomenklatur in einer ständigen Entwicklung ist, was zu Missverständnissen und Widersprüchen bei der Beschreibung und Interpretation der Strukturen führen kann. Zwei unterschiedliche Wege der Benennung sind in der chronologischen Entwicklung in diesem Kapitel dargestellt: eine erste, die auf den Erstbeschreiber einer Struktur zurückgeht. Der Nachteil ist, dass eine eindeutige Definition durch diese Art der Benennung nicht gegeben ist. Eine zweite Möglichkeit der Nomenklatur ist die Einführung eines funktionellen Begriffs, der in kurzer Form eine Definition der Struktur beinhalten kann. In der vorgelegten Arbeit wird dieses Konzept verfolgt und ist stark an die Arbeiten von Dean (1996; 1998) angelehnt.

3. Die untersuchten Arten und ihre Dentitionen im Verlauf der Ontogenese

Um die unterschiedliche Ausprägung der fluorid-induzierten Veränderungen in verschiedenen Zähnen eines Individuums erklären zu können, ist es notwendig die chronologische Abfolge der Entwicklung der postcaninen Dentitionen im Unterkiefer der jeweiligen Art zu betrachten. Für diese Studie wurden bei den drei untersuchten Arten (Reh, Rothirsch und Wildschwein) jeweils der P_4 , der M_1 und der M_3 aus vorhandenen Mandibeln extrahiert und analysiert, womit der gesamte Bildungszeitraum der permanenten postcaninen Dentition erfasst wird. Zusätzlich gibt es Unterschiede in der Lebensweise der drei Arten, die Einfluss auf die Exposition gegenüber einer Fluoridbelastung der jeweiligen Spezies haben können. Im Folgenden werden die drei Arten deshalb kurz vorgestellt und die Abfolge ihrer mandibularen, postcaninen Zahnentwicklung erläutert.

3.1. Das Reh (*Capreolus c. capreolus* L. 1758)

Das Europäische Reh (*Capreolus c. capreolus* L. 1758) ist die häufigste und am weitesten verbreitete Wildwiederkäuerart in Europa. Für das Reh liegen mehrere Artmonographien vor, ein Beleg für die kulturelle und jagdliche Bedeutung der Art (Kurt 1970; Raesfeld 2003a; Stubbe 1997). Eine Zusammenfassung der Morphologie und Ökologie des europäischen Rehs geben Niethammer und Krapp (1986). Kierdorf H (1988) und Kierdorf H und U (1989) beschreiben den Ablauf der Odontogenese bei dieser Art.

Taxonomisch ist das Reh innerhalb der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla) in die Familie der Hirsche (Cervidae) eingeordnet, welche aus vier Unterfamilien besteht: Muntjakhirsche (Muntiacinae), Wasserhirsche (Hydropotinae), Trughirsche (Capreolinae) und Echte Hirsche (Cervinae). Das Europäische Reh gehört mit dem Sibirischen Reh (*Capreolus pygargus* Pallas 1771) zur Unterfamilie der Trughirsche (Danilkin 1995). Die taxonomische Einordnung von Unterarten des Europäischen Rehes, wie z.B. das Mandschurische Reh (*Capreolus c. bedfordi* Thomas 1908) werden diskutiert.

Zum Verständnis der Odontogenese ist es notwendig eine kurze Zusammenfassung der Gebissmorphologie zu geben. Das Rehgebiss ist hemidiphyodont, die Zahnformel des Milchgebisses lautet $\frac{0\ 0(1)\ 3}{3\ 1\ 3}$. Gewechselt werden die Incisivi, Canini und die Prämolaren, zum Dauergebiss hinzu kommen die Molaren. Daraus ergibt

sich für das Dauergebiss folgende Zahnformel: $\frac{0\ 0(1)3\ 3}{3\ 1\ 3\ 3}$. Für die Ruminantia typisch ist das Fehlen der oberen Incisivi. Die oberen Canini können bisweilen rudimentär als sogenannte Haken bei bis zu 5% der Rehe einer Population auftreten (Niethammer und Krapp 1986). Bei Anlage der Haken können diese gewechselt werden, d.h. es treten demnach sowohl C sup. als Milchzähne sowie als Dauerzähne auf. Bei wenigen anderen Arten, wie z.B. dem Muntjak (*Muntiacus reevesi* Ogilby, 1893) treten die oberen Canini durchgehend und voll entwickelt auf, beim Rothirsch (*Cervus elaphus* L.) sind sie reduziert angelegt. Die unteren Canini sind in die Reihe der Incisivi eingegliedert und in Form und Funktion den Schneidezähnen angeglichen (incisiviform). Als Antagonist der Unteren Incisivi dient eine stark verhornte Dentalplatte. Für die Ernährung hat das zur Folge, dass Pflanzen mit den unteren Incisiven und Caninen gegen die Dentalplatte gepresst und ausgerupft werden. Raesfeld (2003, S. 58) schreibt dazu: „... es entsteht dabei keine glatte Schnittfläche, wie etwa beim Hasenverbiss, sondern eine faserige Rupfstelle“. Die mandibularen Frontzähne sind durch ein Diastema von den Backenzähnen getrennt. Die untersuchten Zähne entsprechen dem selenodonten (M₁ und M₃) bzw. dem lophoselenodonten Typ (P₄). Aufgrund der anisognathen Stellung der Zahnbögen zueinander treffen bei zentraler Okklusion die Zähne des Oberkiefers lediglich mit dem lingualen Rand der Kaufläche auf einen bukkalen Rand der Zähne des Unterkiefers. Durch Kauen und Wiederkäuen der Pflanzenteile zwischen den Molaren entsteht ein sekundäres Okklusalrelief nach Abnutzung des Schmelzes. Der Grad der Abnutzung kann als Merkmal zur Bestimmung des Alters berücksichtigt werden. Rehe sind Wiederkäuer, geäst werden leicht verdauliche, energiereiche Pflanzen (Konzentratsselektierer), da ihr Pansenhaubenraum recht klein ausfällt (Niethammer und Krapp 1986). Trockene und feuchte Depositionen (z.B. Fluorid an Staubpartikel gebunden) auf Pflanzenoberflächen werden mit aufgenommen.

Kierdorf H (1988) und Kierdorf H und U (1989) haben die Entwicklung der Dentition des Rehes unter Einbezug der Embryogenese beschrieben. Die Befunde der permanenten postcaninen Dentition sind in Diagramm 1 dargestellt.

Der Beginn der Histodifferenzierung einer Zahnknospe aus der Zahnleiste des Unterkiefers beginnt beim Pd₄ bereits bei einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 1,65 cm. Erste Bildung von Hartgeweben treten ab einer SSL von ca. 9 cm am Pd₄ auf. Die für die vorliegende Untersuchung interessante permanente postcanine Dentition beginnt mit der Histodifferenzierung des M₁ bereits in utero (SSL 7,6 cm).

Erste Bildung von Hartsubstanzen im M_1 werden ca. 4 Wochen vor dem Setzen beobachtet. Die histologische Ausdifferenzierung des M_2 ist bei einer SSL von 25,5 cm zuerst beschrieben worden, die des M_3 ab einer SSL von 31,5 cm. Die Bildung der Hartsubstanzen des M_2 beginnt bereits intrauterin (SSL 38 cm), die des M_3 ist erst ca. einen Monat nach dem Setzen zu beobachten. Die Histodifferenzierung der Ersatzzahnleiste für den P_4 beginnt bereits in utero bei einer SSL von 16,16 cm, die Hartsubstanzbildung der Prämolaren (P_2 - P_4) beginnt erst 6 Monate nach dem Setzen. Als Abschluss der Odontogenese eines Zahnes wird der Eintritt in die Okklusionsebene gesehen. Der M_1 tritt ca. 5-6 Monate post partum in die Okklusionsebene, der M_2 folgt sehr zeitnah. Der M_3 rückt ca. 11-13 Monate post partum in die Okklusionsebene. Ihre Funktion nehmen die Prämolaren mit 13 bis 14 Monaten auf. Die permanente Dentition ist vor dem Ende des linearen Wachstums und dem proximalen Epiphysenschluss vollständig in Okklusionsstellung.

Wichtig für das Wachstum von Zähnen ist die Verfügbarkeit von Kalzium. Faktoren, wie das Säugen und das Skelettwachstum haben Einfluss auf den Kalziumhaushalt. In dieser Phase reagiert die Zahnbildung sehr sensibel auf Störeinflüsse, die Auswirkung auf die Verfügbarkeit von Kalzium haben. Fluorid z.B. ist in der Lage Kalziumionen zu binden und diese der Genese der Hartgewebe zu entziehen (siehe Kapitel 4). Alle postcaninen Zähne der permanenten Dentition werden vor Ende des linearen Wachstums gebildet, der M_1 wird in Teilen in utero angelegt, was einen gewissen Schutz vor Toxinen durch die Plazenta bedeutet. Die Bildungsphase des M_2 verläuft parallel zum Säugen und ist mit der Entwöhnungsphase abgeschlossen. Makroskopisch ist der M_1 beim Reh in fluorotischen Gebissen zu 97 % ohne Befund, die restlichen 3% zeigen nur leichte Veränderungen der Schmelzoberfläche. Der M_2 ist mindestens noch in 43% der fluorotischen Gebisse ohne Befund, 41% zeigen leichte Veränderungen der Schmelzoberfläche und nur bei 13% der M_2 ist die ganze Krone des Zahnes verfärbt und opak. Schwere Veränderungen sind nur in unter 1% der M_2 beschrieben worden (Kierdorf U und H 2000).

Die Bildung des M_3 geht weit über die Entwöhnungsphase hinaus. Die Prämolaren (P_2 - P_4) werden mit Abschluss der Entwöhnungsphase angelegt, das Säugen hat keinen Einfluss mehr auf die Odontogenese. Der Zusammenhang zwischen Zahnbildung, Säugen und Skelettwachstum ist in Diagramm 1 dargestellt, welches den zeitlichen Ablauf der Anlage der postcaninen permanenten Dentition wiedergibt.

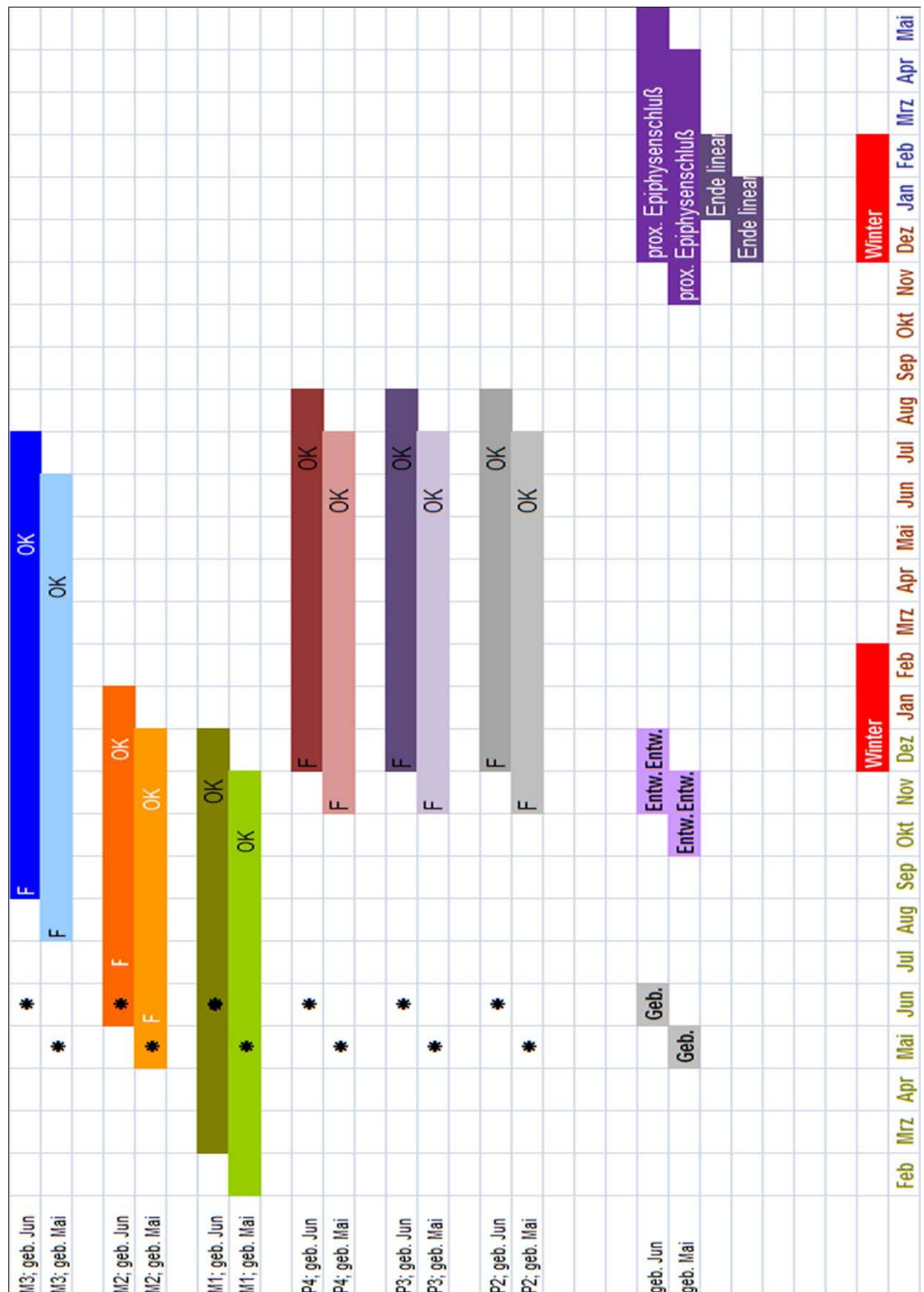


Diagramm 1: Verlauf der postcaninen Dentition des Rehes. Entw.: Entwöhnung; F: Frühe Entwicklung; OK: Okklusion

3.2. Der Rothirsch (*Cervus elaphus* L. 1758)

Der Rothirsch ist nach dem Elch (*Alces alces* L. 1758) die zweitgrößte Hirschart in Europa. In Artmonographien wird die kulturelle und jagdliche Bedeutung des Rothirsches hervorgehoben (z.B. Wagenknecht 1996, Raesfeld 2003).

Niethammer und Krapp (1986) geben eine Zusammenfassung über Morphologie und Ökologie der Art. Den zeitlichen Verlauf der Odontogenese beschreiben Brown und Chapmann (1991 a + b) anhand radiologischer Untersuchungen.

In der Familie der Cervidae ist die Gattung *Cervus* in der Unterfamilie der Echten Hirsche (Cervinae) taxonomisch zugeordnet. Die Anzahl der Arten in der Gattung *Cervus* ist umstritten (Niethammer und Krapp, 1986). Raesfeld (2003) erwähnt 13 Arten. In Europa gibt es 3 Arten der Gattung *Cervus*: *C. elaphus*, *C. nippon* und *C. axis*, diverse Unterarten kommen vor.

Die Gebissmorphologie ist mit der des Rehes vergleichbar. Das hemidiphyodonte Gebiss lässt sich in folgenden Zahnformeln zusammenfassen: Milchgebiss $\frac{0\ 1\ 3\ 3}{3\ 1\ 3\ 3}$, Dauergebiss $\frac{0\ 1\ 3\ 3}{3\ 1\ 3\ 3}$. Die oberen Incisivi sind nicht ausgebildet, in die Reihe der unteren Incisivi haben sich die Canini incisiviform eingereiht. Als Antagonist der unteren Incisivi und Canini dient auch bei den Rothirschen eine Dentalplatte, der Vorgang der Nahrungsaufnahme ist vergleichbar mit dem der Rehe. Bei den Rothirschen treten regelmäßig rudimentäre obere Canini („Grandeln“) auf, welche für die Nahrungsaufnahme keine Funktion haben. In der Brunft werden sie konkurrierenden Männchen als Drohgebärde präsentiert (Eckzahndrohen). Die oberen Canini werden gewechselt und sind sowohl im Milch- als auch im Dauergebiss von Schmelz überzogen.

Auch die untersuchten Zähne des Rothirsches entsprechen dem selenodonten (M_1 und M_3) bzw. dem lophoselenodonten Typ (P_4), wobei die Zähne des Rothirsches hypsodonter als die des Rehes sind. Die Stellung der Kiefer zueinander ist mit der des Rehes vergleichbar. Der Rothirsch wird zum Intermediärtyp unter den Wiederkäuern gezählt, mit Tendenz zum Rauhfutterfresser (Niethammer und Krapp, 1986). Fast alle grünen Gräser und Pflanzen werden geäst, zusätzlich verbeißt er alle grünen Teile, Zweige, kleinere Äste und Früchte vieler Bäume. Auch die Rinde wird geschält. Diese Form der Ernährung mit ausgeprägtem Wiederkäuen führt zu einer charakteristischen Abnutzung der Zähne, welche u.a. zur Bestimmung des Alters herangezogen wird. Pflanzliche Nahrung bietet aufgrund der Beschaffenheit der

Oberfläche die Möglichkeit der Deposition von Immissionen, welche vom Rothirsch mit der Äsung aufgenommen werden kann (siehe Reh).

Die Abfolge der postcaninen Dentition des Rothirsches wird von Brown und Chapmann (1991 a+b) untersucht und ist graphisch in Diagramm 2 dargestellt. Der Beginn der Odontogenese wurde radiographisch erfasst, daher kann die Beschreibung nur ab dem Beginn der Bildung der Krypten im Kiefer erfolgen, die Aufgrund von Resorption des alveolaren Knochen im Röntgenbild dunkel erscheinen. Histologische Befunde der frühen Embryogenese liegen nicht vor. Für die vorliegende Untersuchung ist der Beginn der Mineralisierung von Hartgeweben von Interesse. Adloff (1914) beschreibt Anlagen oberer Milcheckzähne bei einem Rothirschfetus von 12 cm Länge. Die für diese Untersuchung interessante permanente postcanine Dentition beginnt mit der Hartsubstanzbildung des M₁ mindestens einen Monat vor der Geburt. Dieser geht ungefähr mit der Entwöhnung in Okklusionsstellung, die Kronenbildung ist damit abgeschlossen. Selbst eine späte Entwöhnung in dem Fall, dass das Muttertier über Winter nicht wieder trächtig wird, findet vor der Hartsubstanzbildung der permanenten Prämolaren in einem Alter von 12-14 Monaten statt. In Okklusion treten diese in einem Alter von 25-26 Monaten. Die Hartsubstanzbildung der dritten Molaren beginnt zwischen dem 8. und 12. Monat. Sie liegt somit auch nach der Entwöhnung und endet zwischen dem 25. und 26 Monat. Die im Vergleich zum Reh relativ spät einsetzende Hartsubstanzbildung des M₂ des Rothirsches (2 Monate vor der Entwöhnung) bedingt, dass er im Falle einer erhöhten Fluorid-Exposition im Vergleich zum M₂ des Rehes in sehr viel stärkerem Ausmaß Veränderungen der Schmelzoberfläche zeigt (Kierdorf U und H 2000). Hier kommt zum Tragen, dass in der Entwöhnungsphase das Jungtier beginnt selbstständig Nahrung aufzunehmen. Alle Zähne sind vor Ende des linearen Wachstums bzw. dem proximalen Epiphysenschluss in Okklusion. Vor dem Einfluss durch Fluorid ist beim Rothirsch nur der M₁ geschützt, die Mechanismen sind die gleichen, wie beim Reh beschrieben.

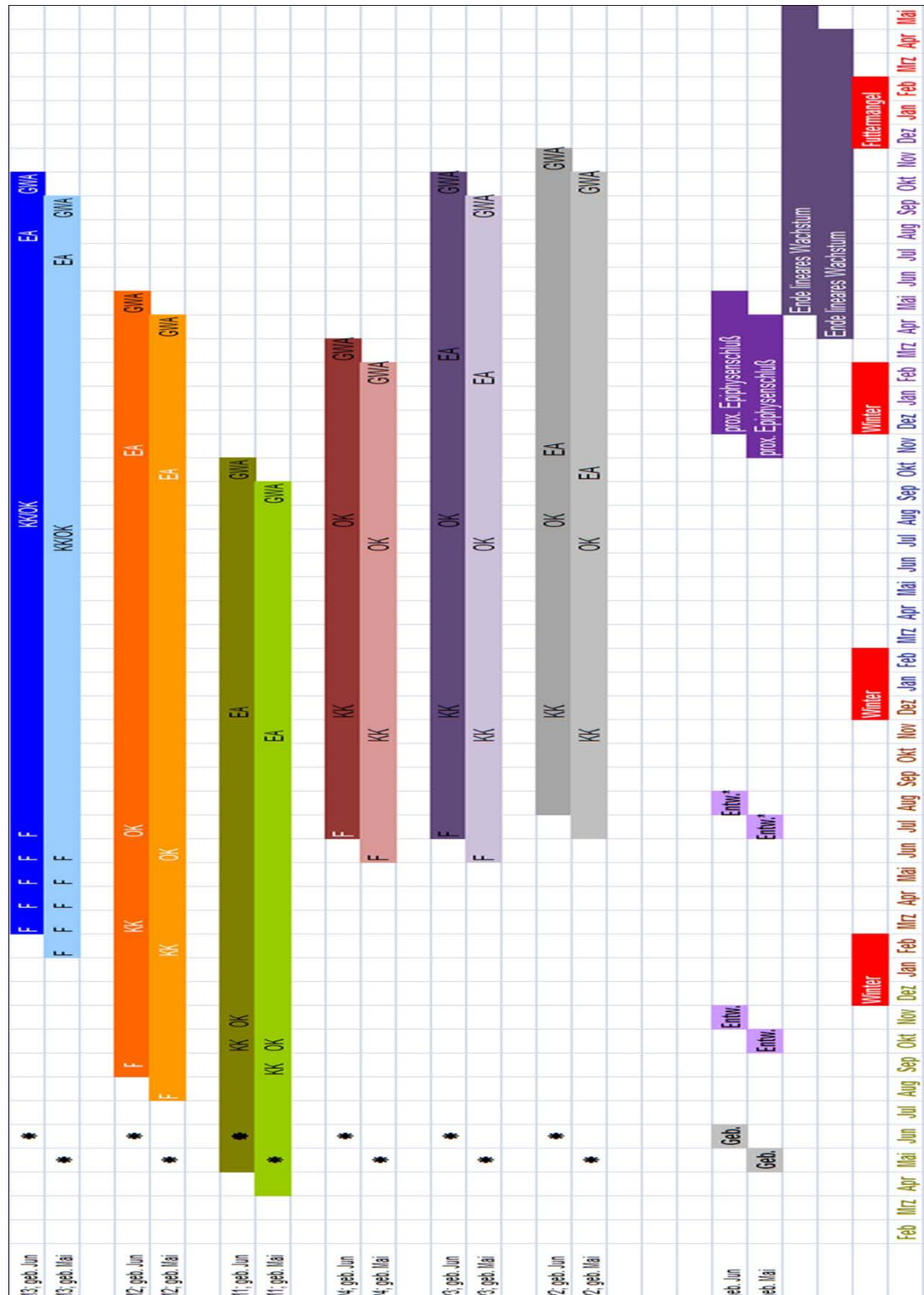


Diagramm 2: Verlauf der postcaninen Dentition des Rothirsches. EA = erstes Auftreten eines geschlossenen Wurzelapex; F Fröhe Entwicklung; GWA = geschlossener Wurzelapex; KK: Krone komplett; OK = Okklusion, Entw.: Entwöhnung; *: Falls Muttertier über Winter nicht wieder tragend wird

3.3. Das Wildschwein (*Sus scrofa* L. 1758)

Das Wildschwein (*Sus scrofa* L. 1758) ist wichtiger Bestandteil der europäischen Wildtierfauna und weit verbreitet. Es ist von großer jagdlicher Bedeutung und auch ein Vorläufer des domestizierten Schweins (z.B. Benecke 1994). Aus diesem Grunde gibt es zahlreiche Artmonographien, die sich hauptsächlich mit Jagd und Hege des „Schwarzwildes“ befassen. Als herausragend sei der Beitrag von Briedermann (1990) genannt. Niethammer und Krapp (1986) beschreiben die Morphologie und Ökologie der Art.

Anders als die zuvor beschriebenen Vertreter der Cervidae gehört das Wildschwein nicht zu den Wiederkäuern sondern zur Unterordnung der Suiformes, die zu den Nichtwiederkäuern zählen und innerhalb dieser zur Familie der Schweine (Suidae). *Sus scrofa* ist der einzige wild vorkommende Vertreter in Europa und die Stammart der europäischen Hausschweine. Weltweit sind neben 4 anderen Gattungen innerhalb der Suidae drei weitere Arten der Gattung *Sus* beschrieben (siehe Briedermann, 1990).

Die Gebissformel des Wildschweines ist sehr ursprünglich für plazentale Säuger, die permanente Dentition entspricht hinsichtlich der Zahnanzahl dem Zustand der ursprünglichen plazentalen Säugetiere. Im Milchgebiss gibt es Abweichungen, die ersten Milchprämolaren sind sowohl im Ober- als auch Unterkiefer reduziert. Die ersten Prämolaren treten unregelmäßig bei nur ca. drei Viertel der Wildschweine auf, wobei geographische Variationen möglich sind. Die Deutung der P_1 als permanente Milchzähne oder Vertreter der permanenten Dentition ist umstritten (Niethammer und Krapp 1986). Daraus ergeben sich folgende Zahnformeln für das Milchgebiss:

$$\frac{3 \ 1 \ 3}{3 \ 1 \ 3}, \text{ und das Dauergebiss: } \frac{3 \ 1 \ 4 \ 3}{3 \ 1 \ 4 \ 3}.$$

Die Incisivi sind stift- bis kegelförmig. Die Canini der Männchen wachsen ständig und werden als „Hauer“ präsentiert, vom Keiler werden sie als Waffen gebraucht. Die Canini der Weibchen hingegen zeigen kein Dauerwachstum. Im Unterschied zu den Cervidae haben die Suidae kein ausgeprägtes Diastema zwischen den Canini und den Prämolaren des Unterkiefers, aber jeweils zwischen dem C^1 und P^1 bzw. zwischen C_1 und P_1 und P_1 und P_2 sind mehr oder minder große Lücken zu finden. Die Molaren der Suidae sind vom bunodonten Typ und stehen im Gegensatz zu den Molaren der Cervidae direkt übereinander. Das sehr ursprüngliche Gebiss der Suidae entspricht einem typischen Allesfressergebiss.

Die Nahrung wird kurz über oder unter der Erdoberfläche durch Wühlen gewonnen. Neben Baumast (Eicheln und Bucheckern) wird tierische Nahrung (Wirbellose und Wirbeltiere, Aas) bevorzugt. Pflanzenteile, die direkter Exposition von Schadstoffen ausgesetzt sind (z.B. Blätter), spielen keine wesentliche Rolle in der Ernährung, ein großer Teil pflanzlicher Nahrung besteht aus unterirdischen Anteilen wie Wurzeln, Knollen und Rhizomen. Weitere Möglichkeiten der Aufnahme von Schadstoffen sind Trinkwasser bzw. Wasser, das beim Wühlen aufgenommen.

Die Odontogenese wurde für domestizierte Schweine (Bull und Payne 1982; Davis 1990; McCance et al. 1961; Owens 1968; Tonge u. McCance 1973) und Wildschweine (Briedermann 1990; Habermehl 1975, Hillson 2005) beschrieben. Zwischen domestizierten Schweinen und Wildschweinen sind Abweichungen in der Chronologie der Zahnbildung festzustellen, daher beruht die folgende Beschreibung der Dentition auf Studien an Wildschweinen. Daten für die Dentition domestizierter Schweine wurden experimentell sowohl unter normalen als auch unter Mangelbedingungen in der Ernährung gewonnen, Vergleiche mit natürlichen Mangelbedingungen können daher gezogen bedingt werden.

Die Reproduktionsphase der Wildschweine endet gewöhnlich mit dem Frischen zwischen März und Mai. Eine zweite Phase der Reproduktion – vor allem bei älteren Individuen - kann mit dem Frischen zwischen August und September enden (Gethöffer et al. 2007). Die Nachkommen dieser Reproduktionsphase wachsen unter herbstlichen und winterlichen Bedingungen auf, die zu Mangelversorgung führen kann. Eine experimentell erzeugte Unterversorgung kann den Start der Bildung der Zahnhartsubstanzen verzögern (Owens, 1968).

Die Bildung der Backenzähne des Dauergebisses des Wildschweines beginnt mit der Anlage des M_1 in utero mindestens einen Monat vor der Geburt. Es folgen ca. einen Monat post partum der P_1 und ca. 2 Monate post partum der P_3 , P_4 und M_2 . Der P_2 wird ca. vier Monate post partum, und als letztes der M_3 6-7 Monate post partum angelegt. Die Kronenbildung des M_1 ist mit ca. 3-4 Monaten abgeschlossen und in Okklusion tritt er mit ca. 6-7 Monate post partum. Damit ist er, wie beim Reh und Rothirsch, während der Entwicklung vor den Einfluss von Fluorid geschützt. Die makroskopische Unauffälligkeit von ersten Molaren in sonst stark fluorotischen Mandibeln von Wildschweinen wurde bereits von Kierdorf H et al (2000) beschrieben. Die Kronenbildung des P_1 ist mit ca. 4-5 Monaten abgeschlossen, mit 11-12 Monaten post partum tritt er in Okklusion. Die Kronen des P_3 und P_4 sind mit

6-8 Monaten fertiggestellt, die des P_2 mit 9-10 Monaten. Die P_2 , P_3 und P_4 treten gleichzeitig ca. 15-16 Monate post partum in Okklusion. Die Krone des M_2 ist ca. 7-9 Monate post partum fertiggestellt und der Zahn geht mit 13-15 Monaten in Okklusion. Als letztes – mit 12 – 13 Monaten ist die Krone des M_3 komplett und er geht mit 22-25 Monaten in Okklusion. Die zeitliche Abfolge der permanenten postcaninen Dentition der Wildschweine sowohl für die frühe (Diagramm 3) als auch für die späte Reproduktionsphase ist in Diagramm 4 dargestellt.

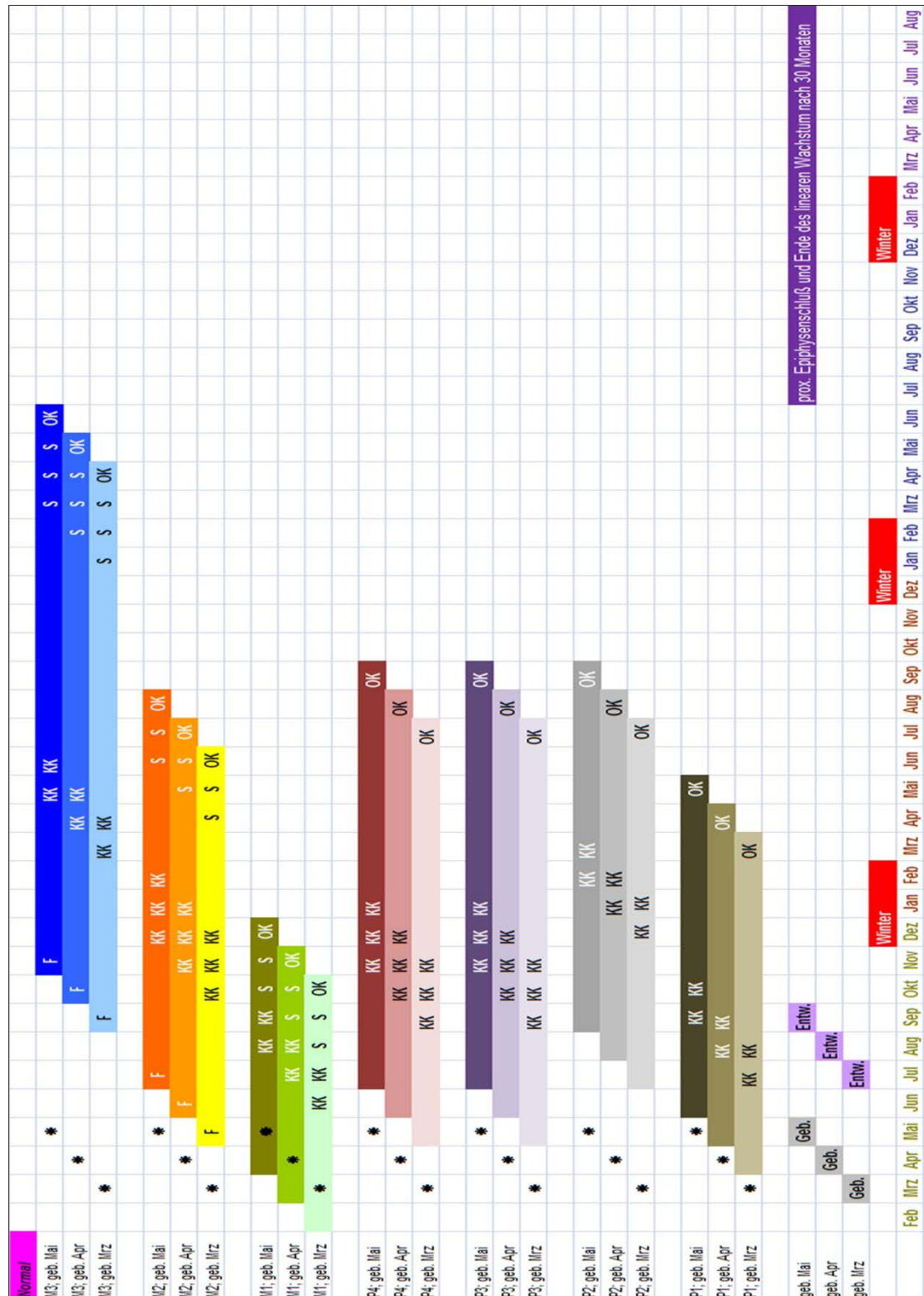


Diagramm 3: Verlauf der postcaninen Dentition des Wildschweins, normale Entwicklung. EA = erstes Auftreten eines geschlossenen Wurzelapex; Entw.: Entwöhnung; *: Falls Muttertier über Winter nicht wieder tragend wird F Frühe Entwicklung; GWA = geschlossener Wurzelapex; KK: Krone komplett; OK = Okklusion, S: Späte Geburtsperiode

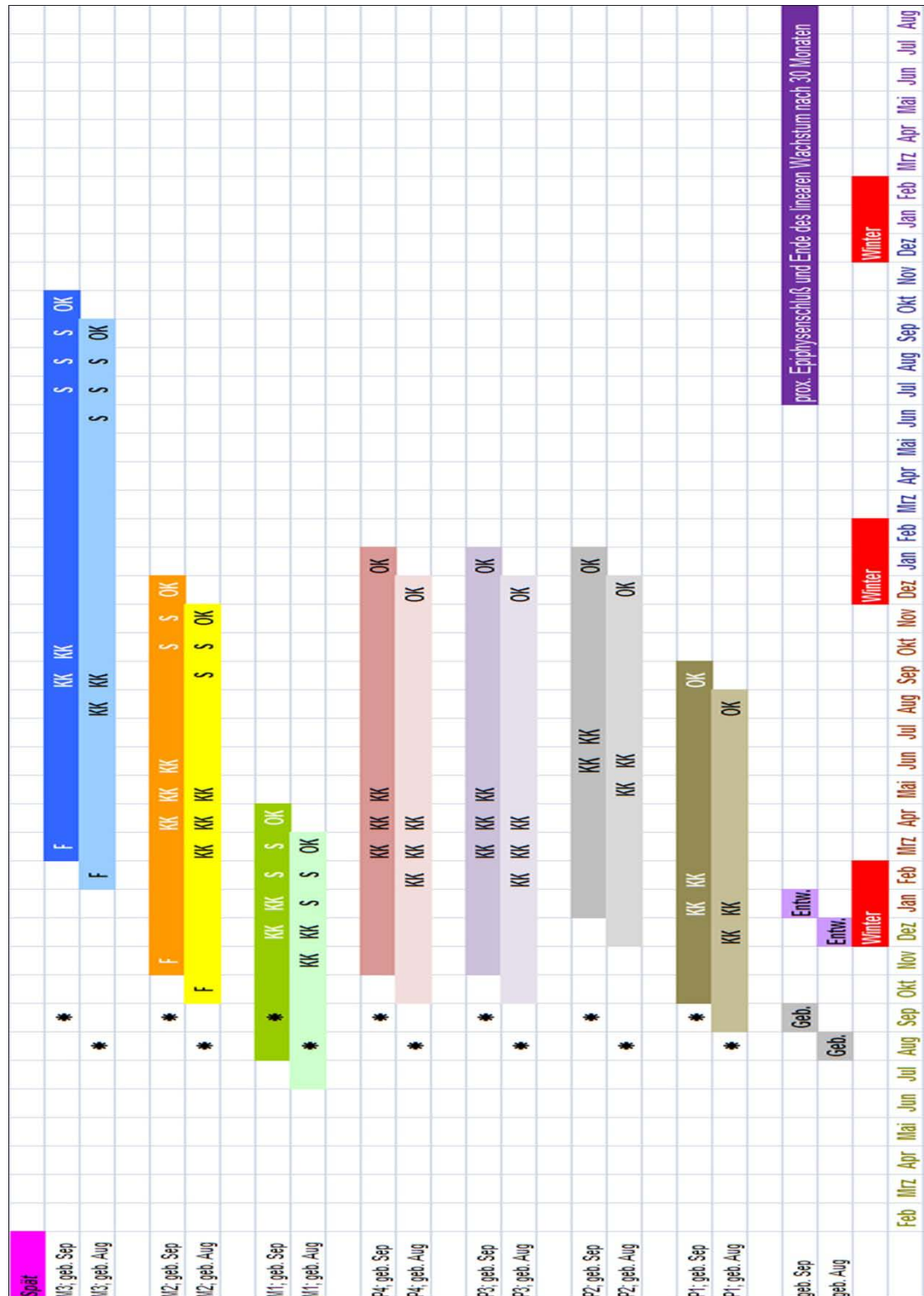


Diagramm 4: Verlauf der postcaninen Dentition des Wildschweins, späte Entwicklung. EA = erstes Auftreten eines geschlossenen Wurzelapex; Entw.: Entwöhnung F Frühe Entwicklung; GWA = geschlossener Wurzelapex; KK: Krone komplett; OK = Okklusion; S: Späte Geburtsperiode

4. Material und Methoden

4.1. Probenmaterial

Die vorliegende Studie wurde an mandibularen Backenzähnen von Rehen (n=7), Rothirschen (n=7) und Wildschweinen (n= 5) durchgeführt. Die Backenzähne zeigten jeweils deutliche Zeichen einer Dentalfluorose. Die Mandibeln wurden in den frühen 1990ern von ortsansässigen Jägern in einer fluorid-belasteten Region gesammelt. Zu dieser Zeit war das Untersuchungsgebiet (Grenzgebiet zwischen der Tschechischen Republik und Deutschland) schwerwiegenden atmosphärischen Fluorid Verschmutzungen ausgesetzt. Verursacher der Emissionen waren hauptsächlich thermische Braunkohlekraftwerke im nordböhmischen Braunkohlebecken.

Als Kontrollproben wurden Anfang der 1990er von jeder Art jeweils zwei Mandibeln aus Gebieten ohne erhöhte Fluoridexposition in Westdeutschland gesammelt. Die Mandibeln der Rothirsche stammen aus dem westlichen Teil des Harzes in Niedersachsen, die Reh und Wildschweinproben stammen aus dem Bergischen Land in Nordrhein-Westfalen. Geringe Fluoridbelastungen dieser Gebiete wurde in früheren Studien durch die Analyse des Knochenfluoridgehaltes bei wildlebenden Rehen demonstriert (Kierdorf H et al. 1996b; Kierdorf U und Kierdorf H 2002). Die Mandibeln mit vollständiger Anzahl Backenzähne wurden routinemäßig von den Jägern abgekocht und vom Weichgewebe befreit. Das Alter wurde anhand des Grades Abnutzung der Backenzähne bestimmt (Habermehl 1985). Die Altersbestimmung der fluorotischen Individuen war aufgrund der anomalen Abnutzung der anderen Backenzähne nur Anhand der ersten Molaren möglich. Das Alter der untersuchten Rothirsche wurden lag zwischen 4 und 9 Jahren, dasjenige der Rehe zwischen 1 und 5 Jahren. Das Alter der Wildschweine lag zwischen 2 und 6 Jahren geschätzt. Zusätzlich wurden den Zähnen der Rehe und Rothirsche der „Dental Lesion Score“ zugewiesen, ein Maß zur Einordnung der Veränderung eines fluorotischen Zahnes. Die Summe der einzelnen „Scores“ werden ergibt den Dental Lesion Index (DLI; Kierdorf U und Kierdorf H 1999, 2000; Kierdorf H et al. 1999)

4.2. Knochenfluoridbestimmung

Für chemische Analysen wurden aus jeder Mandibel Knochenpulverproben aus dem Corpus mandibulare unterhalb des M_1 gesammelt. Die Proben wurden mit einem Bohrer aus dem gesäuberten und getrockneten Knochen gewonnen und nach präziser Auswiegung in 0,1 M Perchlorsäure gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit TISAB II (Orion Research Cambridge MA, USA) gepuffert und mit einer Fluoridionen-spezifischen Elektrode (Modell 96-09, Orion Research) analysiert. Fluoridkonzentrationen wurden in Milligramm pro Kilogramm (= ppm) des trockenen Knochengewichtes dargestellt. Die individuellen Werte verstehen sich als Mittelwert zweier parallel gemessener Proben je Knochenmehlprobe.

4.3. Allgemeine Vorbereitung und Untersuchung der Zahnproben

Um den vollständigen Bildungszeitraum der permanenten postcaninen Dentition zu untersuchen, wurden aus jeder Mandibel drei Zähne extrahiert (P_4 , M_1 und M_3). Die Zähne wurden vorrangig aus der linken Hemimandibel extrahiert, in 6 Fällen wurden Zähne der rechten Hemimandibel extrahiert, da die Zähne der linken Hälfte pathologische Veränderungen nicht fluorotischer Art aufwiesen. Die Zähne wurden fotografiert (Canon EOS D 400) und in Epoxidharz (Epofix, Struers, Kopenhagen, Dänemark) eingebettet. Anschließend wurden die Zähne mit einer wassergekühlten Diamantkreissäge (Woco 50, Conrad, Apparatebau, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) in bucco-lingualer oder mesio-distaler Ebene aufgetrennt. Die daraus resultierenden Hälften wurden für jeweils die weiteren Präparationsschritte verwendet.

4.4. Histologie

Für die histologische Untersuchung der Proben wurde aus einer der beiden Hälften (s.o.) ein Dünnschliff hergestellt. Dazu wurde die Sägefläche mit einer Reihe von Schleifpapieren in aufsteigender Gradation (600, 1200, 2400 und 4000) poliert und auf einen Objektträger aufgeklebt. Der überstehende Block wurde mit der Diamantsäge vom Objektträger abgetrennt. Auf dem Objektträger verblieb ein Schnitt mit einer Stärke von 300 μm , der auf eine Endstärke von ca. 70 μm geschliffen und poliert wurde. Der anschließend eingedeckelte Schliff wurde mit einem Axioskop 2 Plus (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht und mit der integrierten Digitalkamera (Canon Powershot G2, Tokyo, Japan) fotografiert.

4.5. Mikroradiographie

Für die Mikroradiographie wurden von dem verbliebenen Block eine 400 µm dicke Scheiben mit einem Sägemikrotom (Leitz, Wetzlar, Deutschland) abgeschnitten. Die Scheiben wurden – wieder mit Schleifpapieren mit aufsteigender Gradation - beidseitig auf eine Endstärke von 70 µm geschliffen und poliert. Die Mikroradiographien wurden mit einem Baltographe (Balteau, Liege, Belgien) auf Glasfilme aufgenommen (Belichtungszeit: 90 min; Abstand 8,6 cm bei 20 kV und 20mA). Dokumentiert wurden die Mikroradiographien mit dem Zeiss Axioskop 2 Plus.

Zur Erfassung von Mineralisationsunterschieden des Dentins wurden die Mikroradiographien ausgewertet. Dazu wurde der Grad der Mineralisation entlang eines Profils bestimmt, das senkrecht zur Schmelz-Dentin-Grenze orientiert war und bis zur Dentin-Pulpa-Grenzfläche reichte. Drei solcher Profile je Zahn wurden untersucht. Das erste Profil befand sich auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze, das zweite 1 mm cuspal der Schmelz-Zement-Grenze. Ein drittes Profil befand sich beim Reh 3 mm über der Schmelz-Zement-Grenze, bei Rothirsch und Schwein 6 mm darüber. Um die Auswertung in annähernd übereinstimmenden Bereichen der Krone der verschiedenen Arten durchzuführen wurde bei den unterschiedlich großen Zähnen mit diesen Distanzen zur Schmelz-Zement-Grenze der Größenunterschied der Zähne kompensiert.

Entlang eines solchen Profils wurde semiquantitativ der prozentuale Anteil des Dentins mit Mineralisationsstörungen erfasst. Dies konnten einerseits Hypomineralisierungen sein (erkennbar an verstärkter Radiotransluzenz im Vergleich zum umgebenden Dentin) oder Bereiche mit Interglobulardentin. Für eine grobe Bewertung der zeitlichen Abfolge der Beeinträchtigung der Dentinogenese im entsprechenden Zahn wurde das Profil in drei gleiche Abschnitte geteilt: ein an den Schmelz angrenzendes, peripheres Drittel, ein zentrales Drittel und ein inneres, an die Pulpa angrenzendes Drittel. Für jedes Drittel wurde der prozentuale Anteil des Dentins entlang der Profillinie mit Hypomineralisation oder Interglobulardentin gemessen. Anhand der Kriterien aus Tabelle 2 wurde jedem der drei Abschnitte (peripher, zentral, innen) eine von 8 Stufen (Dentin Lesion Score) der Läsion des Dentins zugewiesen. Es muss betont werden, dass die ausgewiesenen Abschnitte des Dentins verschiedene zeitliche Abschnitte der Dentinogenese repräsentieren, abhängig vom individuellen Alter des Zahnes. Der innere Abschnitt eines Zahnes

reflektiert z.B. in einem älteren Zahn ein späteres Stadium der Bildung des (sekundären) Dentins, als der entsprechende Abschnitt eines jüngeren Zahnes.

Die Beziehung zwischen dem Stufen der Läsionen und dem DLI (siehe 1.1.) der drei Dentin-Abschnitte des jeweiligen Zahnes wurde mit der Spearman Rangorder Korrelation analysiert. P-Level von $< 0,05$ zeigen statistische Signifikanz an.

Dentin Lesion Score	Prozentualer Anteil des Dentins mit Mineralisationsstörung	Prozentualer Anteil von Zonen mit Interglobulardentin
0	0-15%	$<10\%$
1	$>15-25\%$	$<10\%$
2	$>25-35\%$	$<10\%$
3	$>35-45\%$	$<10\%$
4	$>45\%$	$<10\%$
5	$>45\%$	10-20%
6	$>45\%$	$>20-30\%$
7	$>45\%$	$>30\%$

Tabelle 2: Grundlage des Dentin Lesion Score. Die Stufen 0-4 werden für die prozentualen Anteile von Mineralisationsstörungen vergeben, Interglobulardentin von unter 10% kann regulär vorkommen. Die Stufen 5-7 werden vergeben, wenn der Anteil der Mineralisationsstörung entsprechend den Anteilen aus Interglobulardentin besteht.

4.6. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) im Rückstreumodus (BSE) wurde die Schnittfläche der zweiten Hälfte der aufgetrennten Zähne (s. Kapitel 4.3) auf einer motorisiertem Schleif- und Poliermaschine (Labopol 5, Struers) poliert. Dazu wurden entsprechende Polierscheiben und -tücher mit der jeweiligen Diamantsuspension (9 und 3 μm Partikeldurchmesser) verwendet. Eine finale Polierstufe wurde mit einer Kolloid Silizium Suspension durchgeführt (Struers). BSE Bilder der polierten Oberflächen wurden mit dem Gerät FEI Quanta 600 FED SEM im Niedrigvakuum mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV erzeugt.

4.7. Mikrosondenanalyse

Für die Mikrosondenanalyse wurden die Proben für die Rasterelektronenmikroskopie mit Kohlenstoff bedampft. Die Zähne wurden mit einer Elektronenstrahl-Mikrosonde (SX 100, Cameca, Paris, Frankreich) mit 10 keV und 40 nA auf Fluorid- und Kalziumgehalt untersucht. Die Elementkonzentrationen wurden auf der polierten Schnittfläche entlang horizontaler Profile 2 mm oberhalb der Schmelz-Zement-

Grenze gemessen. Die Profile reichten von der Schmelzoberfläche bis zur Dentin-Pulpa-Grenzfläche mit Intervallen von 120 µm zwischen den einzelnen Messpunkten. Vor der Analyse wurden die Positionen dieser Messpunkte (ø 10 µm) entlang der Profile mit einem Auflichtmikroskop (DMRX DL/AL, Leica, Wetzlar, Germany) mit integrierter Kamera und Computer gestütztem Point-logger System definiert.

Die Nachweisgrenze für Kalzium und Fluorid war ungefähr 0,03 Gew.%. Oberhalb dieser Konzentration wurde die Elementkonzentration mit einer Genauigkeit von 0,01 Gew. % gemessen. Für die statistische Analyse unterschiedlicher Fluoridkonzentrationen innerhalb von Einzelzähnen und zwischen Zähnen des gleichen Individuums oder verschiedener Individuen einer Art wurden Fluoridwerte unterhalb der Nachweisgrenze auf die Hälfte dieser gesetzt (0,015 Gew. %). Die Elektronenstrahl-Mikrosonde wurde mit einem Fluorapatit Standard kalibriert. Er setzte sich wie folgt zusammen: Ca = 38,94%; P = 17,86%; F = 3,70%.

Um zeitliche Variationen der Fluoridaufnahme während der Dentinogenese zu erfassen (Variation der Fluoridaufnahme innerhalb eines Zahnes) wurden die Konzentrationen des früh gebildeten, peripheren Dentins (an der Schmelz-Dentin-Grenze) und des spät gebildeten, juxtapulpalen Dentins ermittelt. Die Fluoridkonzentration des früh geformten Dentins wurde als das arithmetische Mittel der Konzentrationen der ersten drei Messpunkte im Dentin (nahe der Schmelz-Dentin-Grenze) kalkuliert. Die Fluoridkonzentration des spät gebildeten Dentins entsprach demnach den drei letzten (juxtapulpalen) Messpunkten des Profils im Dentin. Einige Proben wiesen kleine Trocknungsrisse in den gemessenen Geweben auf. Bisweilen trafen Messpunkte entlang der Profile teilweise oder vollständig auf solche Risse. Diese Fälle konnten klar identifiziert werden, da die Kalziumkonzentration an solchen Messpunkten sehr niedrig im Vergleich zum umliegenden Gewebe war. Die Messwerte dieser Punkte wurden ersetzt durch die Werte des nächsten, zentripetal oder zentrifugal gelegenen Messpunktes entlang des Profils.

Im fluorotischen Dentin wurden die Fluoridkonzentrationen des peripheren (früh-geformten) und des juxtapulpalen (spät geformten) Dentins eines jeden Zahntyps (Variation innerhalb eines Zahnes) mit dem „Wilcoxon matched pairs test“ (zweiseitig) verglichen. Das kritische Signifikanzlevel lag bei $\alpha = 0,05$. Die Variation der Fluoridkonzentrationen zwischen den drei untersuchten Zahntypen (P₄, M₁ und

M₃) wurde mit „Friedman ANOVA“ analysiert. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes wurde post-hoc ein zweiseitiger „Wilcoxon matched pairs test“ mit Bonferroni α -Abgleichung durchgeführt. Um ein Signifikanzlevel von 0,05 zu erreichen mussten die P-Werte der vorrangegangenen Test kleiner als der korrigierte α -level von $0.05/3 = 0.0167$ sein. Alle statistischen Tests wurden mit dem Softwarepaket STATISTICA, Version 8 (StatSoft, Tulsa OK, USA) durchgeführt.

5. Die Odontogenese unter Einwirkung von Fluorid

In diesem Kapitel sollen zunächst die makroskopischen und die mikroskopischen Befunde der Dentalfluorose aus der Literatur zusammengefasst werden. Anschließend werden die mikroskopischen Befunde der Dentalfluorose für das Dentin aus der eigenen Untersuchung erläutert und um die Ergebnisse der Elementaranalysen des Knochens und der untersuchten Zähne ergänzt.

5.1. Makroskopische Befunde der Dentalfluorose

Die Auswirkungen von Fluorid auf den (Säugetier-) Organismus sind vielfältig. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften beeinflusst Fluorid insbesondere die Prozesse der Biomineralisation (Whitford 1996). Die Symptome einer chronischen Osteofluorose im gesamten Skelettapparat sind sehr umfangreich. Beispiele, welche auch den Unterkieferknochen betreffen können, reichen von leichten Hypomineralisierungen bis zu stark sklerotischen oder deformierten Knochen. Osteofluorose bei Menschen ist hauptsächlich in Gebieten verbreitet, in denen hohe Fluoridkonzentrationen im Trinkwasser gelöst sind, oder in Öfen stark Fluoridhaltige Kohle verfeuert wird und entstehende Stäube inhaliert bzw. mit der Nahrung aufgenommen werden (WHO 2002). Einzelne Fälle von Überdosierungen durch exzessive Aufnahme fluoridhaltiger Lebensmittel (z.B. löslicher Tee) sind beschrieben (Whyte et al. 2008).

Da sich Fluorid-bedingte Veränderungen in den Hartgeweben manifestieren, sind diese besonders für Monitoringprojekte geeignet. Studien können z.B. an Material aus dem normalen Jagdbetrieb durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Umbauprozesse (z.B. im Vergleich zum Knochen) sind die Zahnhartgewebe besonders geeignet, um Aussagen über die Chronologie von Fluoridbelastungen treffen zu können. Am einfachsten zu untersuchen sind die makroskopischen Veränderungen der Zahnoberfläche, die bei den untersuchten Arten hauptsächlich aus Schmelz besteht.

Die Bildung makroskopisch sichtbarer Dentalfluorose beschränkt sich auf den Zeitraum der Amelogenese. Fejerskov et al (1994, 1996) beschreiben die Dentalfluorose für den Menschen und entwickelten einen Index zur Klassifikation der Dentalfluorose (TF-Score). Der Index umfasst zehn Stufen von TF score 0-9 wobei Stufe 0 die Klassifikation für einen gesunden Zahn darstellt. Die Stufen 1 bis 4 sind durch opake Linien auf der Schmelzoberfläche gekennzeichnet, die

entsprechend der Perikymatien verlaufen. Mit steigenden Stufen sind diese Linien stärker akzentuiert. Die Stufen 5 bis 7 weisen zusätzlich rundliche bis ovale Vertiefungen im Zahnschmelz auf, welche auffällige bräunliche Verfärbungen zeigen können. Bei Stufe 8 geht posteruptiv mindestens ein Viertel der Zahnschmelzoberfläche verloren, bei Stufe 9 wesentlich mehr. Diese Zähne sind anfälliger für Abrasion und verlieren schneller ihre funktionale Form.

Karstad (1967) beschrieb als erster die Situation einer Dentalfluorose an Cerviden Zähnen. Neben den primären Veränderungen des Zahnschmelzes treten beim untersuchten Weißwedelhirsch auch sekundär Frakturen des Unterkiefers auf. Suttie (1985) rekonstruiert eine chronische Fluoridintoxikation beim Weißwedelhirsch. Zwei Jahre später beschreibt er die Effekte von chronischer Fluoridintoxikation bei einer Population wildlebender Weißwedelhirsche im Einzugsgebiet einer Aluminiumhütte (Suttie et al 1987). Seine Befunde decken sich mit denen von Karstad, sind aber nicht in Schadstufen klassifiziert.

Einen dem TF-Index äquivalenten Index für Dentalfluorose bei Cerviden haben Kierdorf H et al (1996a) etabliert und für Monitoringprojekte eingesetzt (Kierdorf H et al. 1999, Zemek et al. 2006). Jedem der permanenten Molaren und Prämolaren einer Hemimandibel wird jeweils eine Schadstufe zwischen 0 und 5 zugeordnet und ein Dental Lesion Index (DLI) für eine Hemimandibel aus der Summe der Schadstufen errechnet. Kriterien für die Vergabe der Schadstufen (Tab. 3) sind unter anderem beginnende Verfärbung und Opazität des Schmelzes (Schadstufe 1) die sich von der Spitze über den ganzen Zahn (Schadstufe 2) ausbreiten und Schmelzkanten gehen teilweise verloren. Zähne mit Schadstufe 3 verlieren diese Schmelzkanten ganz und bis zu 5% der Schmelzoberfläche zeigt Läsionen. Bis 25% der Läsionen der Schmelzoberfläche charakterisieren Zähne mit Schadstufe 4, zusätzlich ist die normale Zahnkronenform nicht mehr erhalten. Geht die Funktion der Zahnkrone aufgrund der Läsionen ganz verloren, ist Stufe 5 erreicht, mehr als 25% der Schmelzoberfläche sind lädiert. Auffällig ist die signifikant positive Korrelation zwischen DLI und Knochenfluoridgehalt der Mandibel, es gibt aber keine direkte Kausalität. Die Veränderungen der Schmelzoberfläche beschränken sich nicht nur auf den Zeitraum der Amelogenese, sekundärer Schmelzverlust Aufgrund der Hypomineralisation ist umso größer, je stärker die primäre Schädigung während der Amelogenese erfolgte. Der Knochenfluoridgehalt stellt die Netto-Akkumulation von Fluorid zum Zeitpunkt des Todes dar. Umbauprozesse im Knochen können bei

Aussetzen der Fluoridaufnahme auch zu einer Abnahme des Knochenfluoridgehaltes führen.

Die für die vorliegenden Arbeiten untersuchten Cervidengebisse wurden nach dem DLI klassifiziert und ausgewählt. Ein DLI für Schweinezähne existiert nicht. Diese Proben wurden aufgrund der Läsionen der Schmelzoberfläche ausgewählt, die äquivalent dem TF-Score und dem DLI sind.

Die Ergebnisse der Freilandstudien lassen sich experimentell rekonstruieren: Eine anormal starke Abnutzung der Zähne ist bei Schafen beschrieben, denen experimentell Fluorid verabreicht wurde (Milhaud et al 1992). Shearer et al. (1978) erzeugen durch experimentelle Gabe von Fluorid vergleichbare Läsionen an Rinderzähnen. Suttie & Faltin (1971) weisen nach, dass diese beschriebenen Veränderungen bei Rindern durch Unterernährung verstärkt werden können.

Einige Mandibeln der Cerviden aus den oben genannten Studien wurden von Schultz et al (1998) untersucht. Sekundäreffekte der Dentalfluorose und der damit verbundenen verstärkten Abnutzung, bzw. Zahnfrakturen sind eine Vielzahl verschiedener Knochenveränderungen unter Einschluss des Zahnhalteapparates. Zu erwähnen sind Veränderungen des Periodontiums, Periostitis, Osteitis, chronische Osteomyelitis und Öffnungen der Pulpa mit einhergehenden periapikalen Abszessen. Zahnverlust bei schwerer Störung des Periodontiums wurde beobachtet. Zusätzlich zeigten diese Mandibeln osteofluorotische Veränderungen, die den Zustand des Unterkiefers nachhaltig verschlechterten.

Schadstufe	Charakteristika des Zahnes
0	Normale Schmelzbeschaffenheit (transparent und glänzend). Altersgemäße (physiologische) Zahnabnutzung.
1	Auftreten opaker Schmelzareale. Posteruptiv gelbliche bis bräunliche Verfärbung des Schmelzes. Stärkere Verfärbung in der Regel linienhaft. Opazität und Verfärbung zumeist auf Cuspalregion des Zahnes beschränkt.
2	Gesamter Schmelz opak und bräunlich verfärbt. Eine deutliche Reduktion bis hin zu einem vollständigen Verlust der okklusalen Schmelzkanten tritt auf.
3	Vollständiger Verlust der Schmelzwülste und, dadurch bedingt, abnorme Abflachung der Okklusalfäche. Auftreten von Oberflächendefekten des Schmelzes, die bis zu 5% der Zahnkrone betreffen.
4	Abnorme Form der Zahnkrone als Folge pathologisch verstärkter Zahnabnutzung. Auftreten von Schmelzdefekten in 5% - 25% der Kronenoberfläche.
5	Dysfunktionale Zahnform als Folge übermäßiger Abnutzung. Mehr als 25% der Zahnoberfläche mit Defekten. Zahnverlust als Folge von Parodontopathien sowie Auftreten von Zahnfrakturen.

Tab. 3: Dental Lesion Index (DLI) für den Zahnschmelz von Cerviden (Kierdorf H et al. 1996a)

5.2. Mikroskopische Befunde im Zahnschmelz

Die Zähne der Mandibeln, die von Kierdorf H et al. (1996a, 1999) bzw. Kierdorf U und H (2000) für die Entwicklung des DLI und entsprechende Monitoringstudien makroskopisch erfasst wurden, sind auch histologisch, mikroradiographisch und mit dem REM untersucht worden (Kierdorf H und U. 1997, Kierdorf H et al. 1997, Kierdorf U 1988, Kierdorf U und H 1989, 2000, Kierdorf U et al. 1993, 1996). Wildschweinzähne aus diesem Gebiet sind ebenfalls untersucht worden (Kierdorf H et al. 2000). Histologische Befunde zeigen sowohl bei den Cerviden als auch bei den Suiden stark akzentuierte Retziuslinien im Schmelz. Die oberflächlichen Schmelzhypoplasien sind als Einsenkungen der Schmelzoberfläche im Schliff zu sehen. Von posteruptiven Schmelzverlusten sind diese Einsenkung am Verlauf der Retziuslinien zu unterscheiden; Retziuslinien laufen nicht gerade auf eine

Einsenkung zu und enden abrupt (wie bei posteruptivem Schmelzverlust), sondern die Mineralisierungsfront zeichnet die Form der Hypoplasie nach. Die Inkremente in diesem Bereich sind entsprechend dünn, die Anzahl der Inkremente ist identisch zu Bereichen ohne Hypoplasien. Aprismatischer Schmelz tritt gehäuft in den Einsenkungen größerer Hypoplasien auf. In der Mikroradiographie sind hypoplastische Oberflächendefekte zu erkennen und stark akzentuiert, hypomineralisierte Retziuslinien sind prominent. Im Vergleich zu Kontrollen ist der Schmelz fluorotischer Zähne stark untermineralisiert. Fluorotisch induzierte Schmelzdefekte mit entsprechenden Befunden haben Kierdorf H et al. (2004) bei Miniaturschweinen durch experimentelle Fluoridgabe erzeugt. Die experimentell erzeugten Befunde sind äquivalent zu den Befunden an frei lebenden Wildschweinen mit Dentalfluorose.

Makroskopisch sind nicht immer alle Schmelzdefekte zu erkennen. Kierdorf H et al. (2005) haben festgestellt, dass Schmelzhypoplasien teilweise unter Ablagerungen verborgen sind, die mithilfe histologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchung als zellulärer Zement und teilweise als Plaque identifiziert wurden. Kronenzement kommt bei Schweinen regulär nicht vor. Es wird vermutet, dass das Vorhandensein dieses Gewebes in fluorotischen Zähnen auf eine prämatüre Desintegration des Schmelzepithels hindeutet, die zu einem Kontakt von mesenchymalen Zellen des Zahnfolikels mit der Oberfläche des unreifen Schmelzes führt. Der Kontakt dieser mesenchymalen Zellen mit dem unreifen Schmelz induziert die Differenzierung zu Zementoblasten.

Richards et al. (1986) untersucht den Einfluss von Fluorid auf den postsekretorischen Schmelz von Schweinen. Hypomineralisation tritt auch im postsekretorischen Schmelz von vierten Prämolaren auf, die experimentell während der Reifungsphase chronisch mit Fluorid belastet wurden. Richards et al. haben somit mit histologischen und mikroradiographischen Methoden nachgewiesen, dass Fluorid während der Amelogenese auch Einfluss auf die Schmelzreifung hat.

5.3. Fluorid-induzierte mikroskopische Veränderungen im Dentin

Die Symptome der Dentalfluorose im Dentin sind Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Für Reh und Rothirsch sind diese in der entsprechenden Publikation (Anhang 1, Richter et al. 2010) dargestellt. Die Befunde fluorid-induzierter Veränderungen im Dentin des Wildschweins sollen im Folgenden beschrieben werden:

Die histologische Untersuchung des Dentins fluorotischer Wildschweinzähne zeigt Mineralisationsdefekte unterschiedlicher Ausprägung. Diese Defekte sind einzelne oder multiple hypomineralisierte Zonen (ALPI's, Abb. 6a) bzw. Interglobulardentin (IGD; Abb. 6b), welche als Zone parallel zu den inkrementellen Linien verlaufen und an der Schmelz-Dentin Grenze auf akzentuierte Retzius-Linien treffen können (Abb. 6a). Beide Mineralisationsdefekte manifestieren sich entlang dieser Störungszone als Hypomineralisierung und/oder als Interglobulardentin in Abhängigkeit vom Ausmaß der Beeinträchtigung des Mineralisationsvorganges.

Im IGD sind die Kalkospheriten nicht oder unvollständig fusioniert, es verbleiben Lücken in Mineral, welche im histologischen Bild schwarz erscheinen. Interglobulardentin wird als stärkere Ausprägung der Mineralisationsstörung interpretiert, da beide entlang einer Linie auftreten können, aber der Mineralisierungsprozess im IGD ist stärker gestört, als in ALPI's. Mikroradiographien zeigen, dass ALPI's untermineralisiert sind, das IGD stellt unmineralisierte Bereiche dar (Abb. 7c). Untermineralisierte Bereiche in der Mikroradiographie sind röntgendichter als die radioluzenten Bereiche zwischen den nicht fusionierten Kalkospheriten. Die Aufnahmen mit dem REM zeigen zwischen den nicht fusionierten Kalkospheriten die organische Matrix (Abb. 6c).

Die Breite der Zonen veränderten Dentins variiert sowohl innerhalb eines Zahnes, als auch zwischen den Zähnen eines Individuums. Auch die Ausdehnung dieser Zonen entlang der vertikalen Zahnachse zeigte merkliche intra-individuelle und interindividuelle Variation. Zähne aus Mandibeln mit hohen Fluorid-Konzentrationen, deren Schmelz stark verändert war, zeigten oft multiple, parallele hypomineralisierte Zonen und IGD.

Die Veränderungen des Dentins können in Zusammenhang gebracht werden mit Veränderungen des Schmelzes. An der Schmelz-Dentin Grenze treffen akzentuierte Retziuslinien des Schmelzes auf hypomineralisierte Linien des Dentins. Der Ursprung der Linien im Dentin an der Schmelz-Dentin-Grenze liegt leicht weiter zervikal.

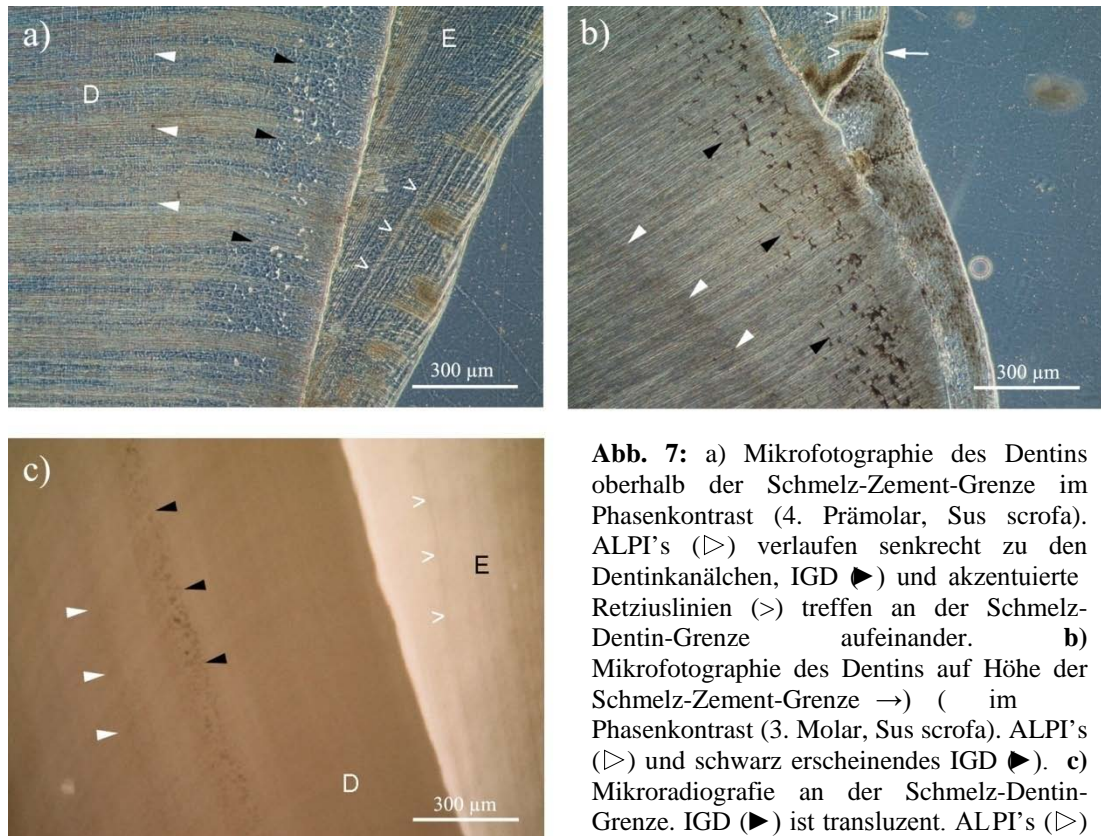
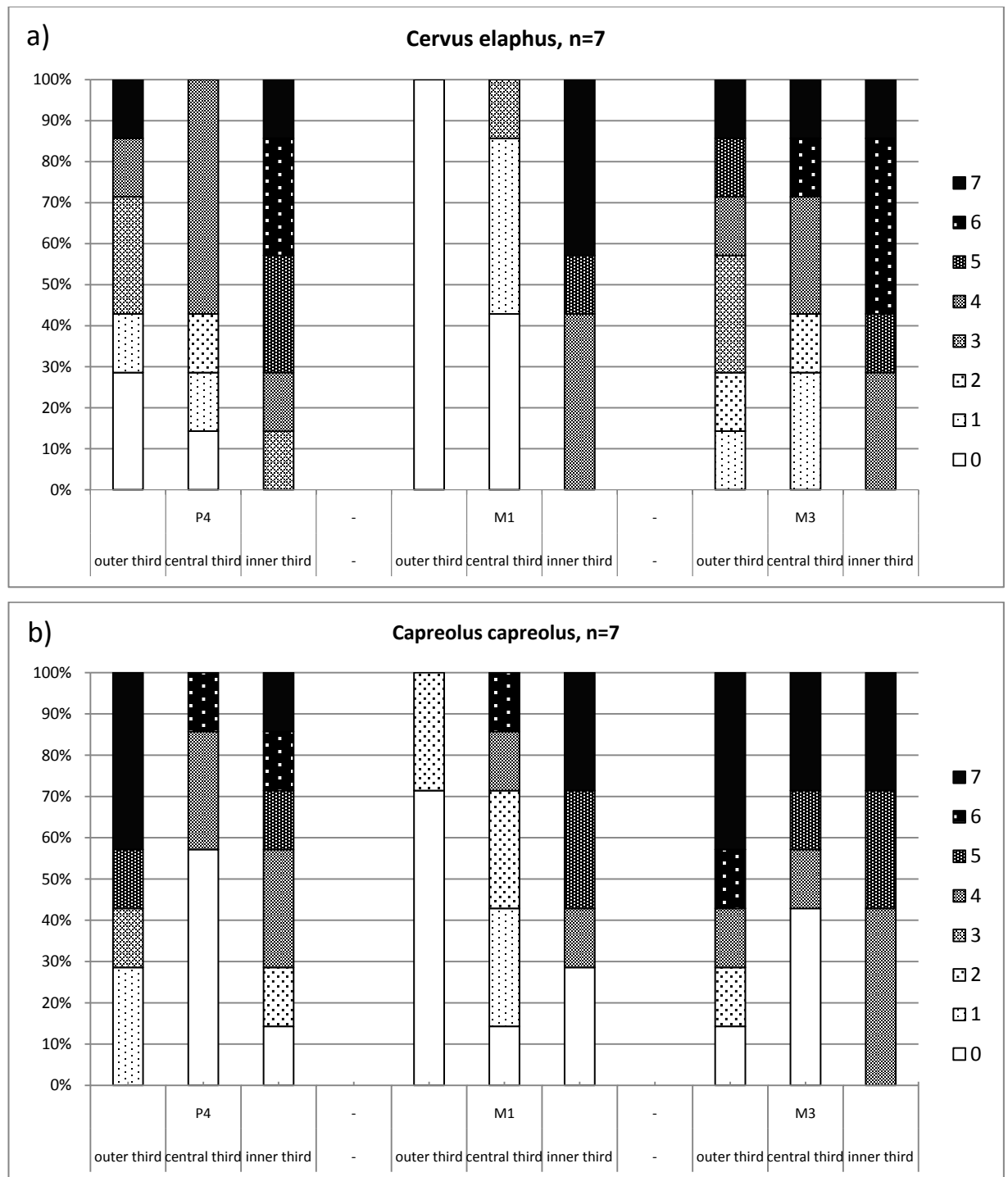


Abb. 7: a) Mikrofotographie des Dentins oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze im Phasenkontrast (4. Prämolare, *Sus scrofa*). ALPI's (▷) verlaufen senkrecht zu den Dentinkanälchen, IGD (◀) und akzentuierte Retziuslinien (>) treffen an der Schmelz-Dentin-Grenze aufeinander. b) Mikrofotographie des Dentins auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze → (im Phasenkontrast (3. Molare, *Sus scrofa*)). ALPI's (▷) und schwarz erscheinendes IGD (◀). c) Mikroradiografie an der Schmelz-Dentin-Grenze. IGD (◀) ist transluzent. ALPI's (▷) und akzentuierte Retziuslinien (>) sind hypomineralisiert. E: Schmelz, D: Dentin.

Die Ausprägung und die Verteilung der Veränderungen im Dentin variieren zwischen und innerhalb der drei analysierten Zähne einer fluorotischen Backenzahnreihe. Um diese Unterschiede zu erfassen, wurde für Reh und Rothirsch erstmals der Dentin Lesion Score eingeführt. Die Bewertung des Dentins mit dem Dentin Lesion Score macht deutlich, dass in allen fluorotischen ersten Molaren des Rothirsches das äußere Drittel des Dentins frei von pathologischen Veränderungen war (Score 0). Bei den Rehen waren zumindest 71% frei von Veränderungen, 29% zeigten leichte Veränderungen, die über einen Score von 2 nicht hinausgingen.

Im Kontrast dazu zeigte das innere Drittel des Dentins der Rothirsche Scores zwischen vier und sieben in allen ersten Molaren, das der Rehe in immerhin 71% der untersuchten ersten Molaren. Das mittlere Drittel des Dentins dieser Zähne zeigte intermediäre Scores (bis zu 28% ≥ 3). Im Gegensatz dazu zeigten die P_{4s} und M_{3s} der fluorotischen Mandibeln merkbare Veränderungen in allen drei Dritteln (Scores ≥ 4), wobei das innere Drittel am stärksten verändert war. Die Ergebnisse der Analyse sind in Diagramm 5 zusammengefasst.



Dia. 5: Frequenzen des Dentin-Score im äußeren, mittleren und inneren Drittel des Dentins, dargestellt für die P4, M1, und M3 von fluorotischen Rothirschen (a) und Rehen (b)

Die Analyse der Schweinezähne mit dem Dentin Lesion Score brachte keine eindeutigen Ergebnisse. Obwohl der Schmelz der ersten Molaren oberflächlich frei von Veränderungen war, war die Verteilung des Dentin Lesion Scores im ersten Drittel der ersten Molaren ähnlich der der anderen untersuchten Zähne. Der Unterschied zu den Rehen und Rothirschen bedarf besonderer Diskussion, die

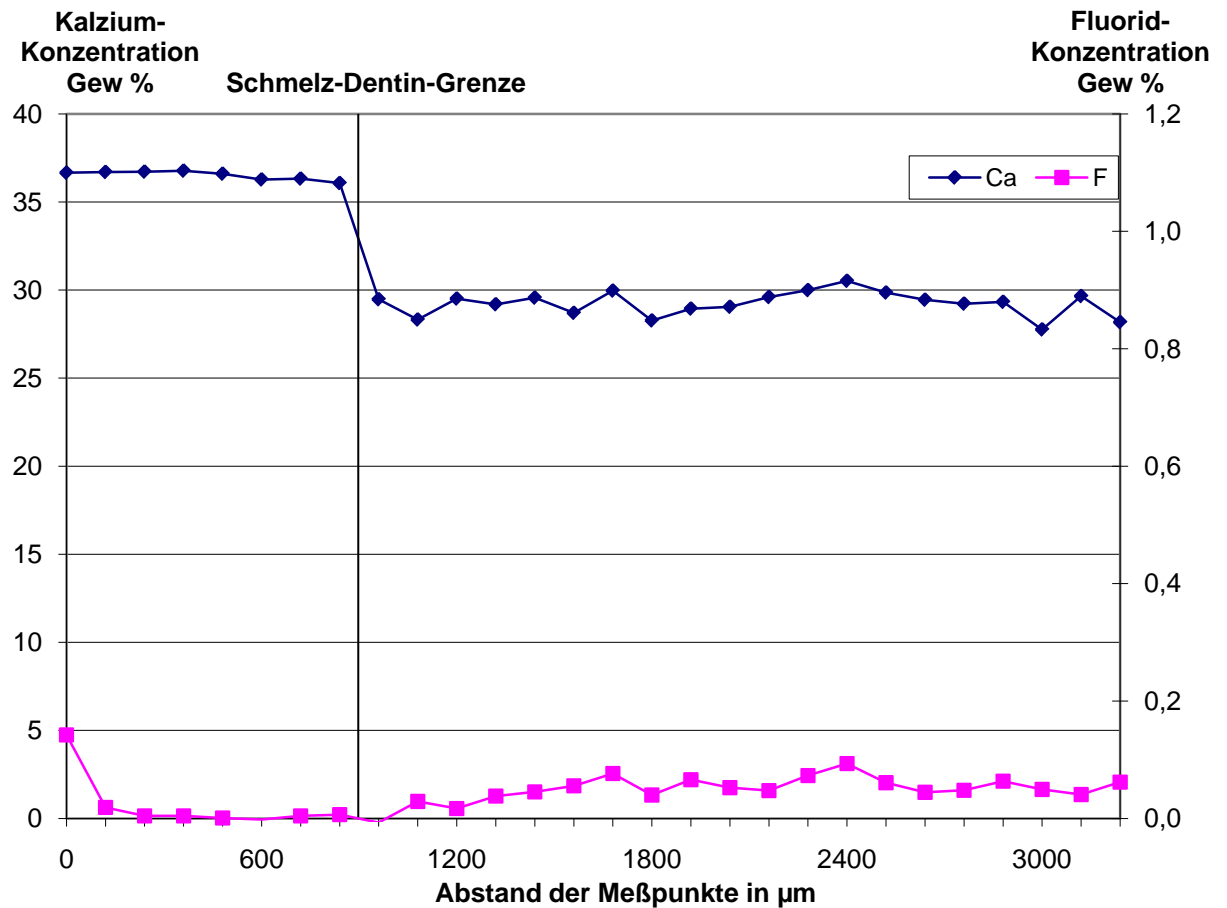
Stichprobe der Wildschweine war sehr gering und ein Kontrolltier zeigte ebenfalls Veränderungen im Dentin vergleichbar mit denen der fluorotischen Tiere.

5.4. Elementanalyse

Für die vorliegende Studie wurden zwei verschiedene Elementanalysen durchgeführt: die Bestimmung des Knochenfluoridgehaltes jedes Individuums ionenspezifisch aus der Mandibel unterhalb des ersten Molaren mithilfe einer Elektrode. Zusätzlich wurde von jedem der untersuchten Zähne mit einer Mikrosonde ein Profil im bucco-lingualen bzw. mesio-distalem Schliff erstellt. Entlang dieses Profils von der Schmelzoberfläche bis zur Dentin-Pulpa-Grenzfläche wurden der Kalziumgehalt und der Fluoridgehalt gemessen.

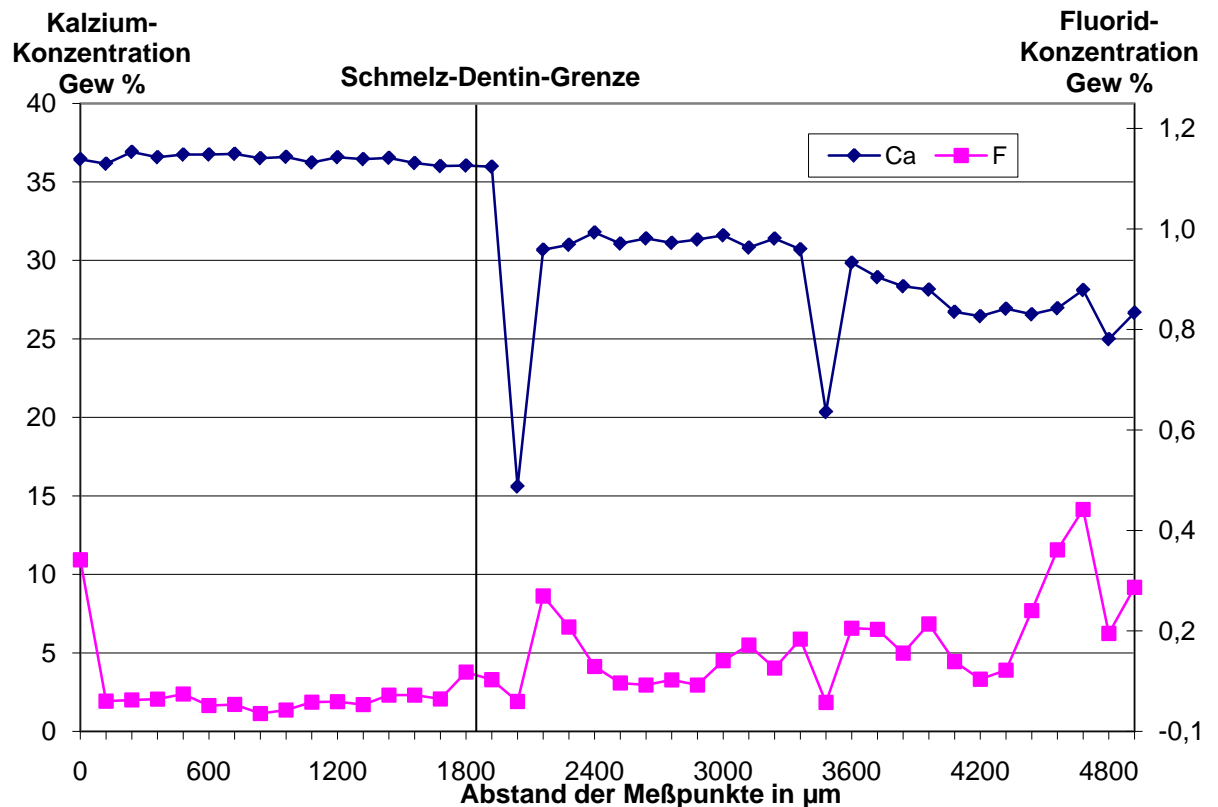
Der Knochenfluoridgehalt in nicht fluorotischen Kontrollindividuen war sehr gering (Reh: 149 mg F/kg Trockengew., Rothirsch: 323 mg F/kg Trockengew., Wildschwein 181 mg F/kg Trockengew.). Die Kontrollproben waren demnach nur geringen Mengen Fluorid ausgesetzt. Viel höhere Konzentrationen wurden in fluorotischen Individuen aus Nordböhmen gemessen (zwischen 859 mg F/kg Trockengew. und 3790 mg F/kg Trockengew.) Die Knochenfluoridgehalte der Wildschweine waren insgesamt etwas niedriger als die der untersuchten Cerviden (Tab. 4). Die Messung des Knochenfluoridgehaltes bestätigt die Hypothese, dass die Individuen exzessiven Fluoridbelastungen ausgesetzt waren. Dieser Schluss wird zumindest für die Cerviden durch entsprechend hohe Werte des DLI unterstützt (zwischen 13 und 24). Für die Wildschweine existiert ein vergleichbarer Index nicht, aber Tiere mit erhöhten Knochenfluoridgehalten zeigten verstärkte Veränderungen der Schmelzoberfläche (mit Ausnahme der ersten Molaren).

Fluoridkonzentrationen im Dentin der drei analysierten Zähne der Kontrollindividuen waren jeweils sehr gering, nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze (0,03 Gew. %) der Elektronenmikrosonde. Im Gegensatz dazu waren die Fluoridkonzentrationen im Dentin fluorotischer Zähne wesentlich höher, ausgenommen im peripheren (früh gebildeten) Dentin der ersten Molaren. In der Mehrzahl der ersten Molaren war die Fluoridkonzentration im peripheren Dentin unterhalb der Nachweisgrenze von 0,03 Gew.% (Diagramm. 6).



Dia. 6: Kalzium- und Fluoridprofile in einem bucco-lingualen Schliff eines M_1 eines fluorotischen Gebisses (Individuum Nr. Sus 13, Knochenfluoridgehalt: 1435 mg/kg Trockengewicht, Alter: 6 Jahre)

Die Fluorid- und Kalziumkonzentration entlang eines Profils eines fluorotischen M_3 ist in Diagramm 7 dargestellt. In allen Fällen ist eine merkliche Fluktuation der Fluoridkonzentrationen entlang des Messprofiles zu beobachten. Im Schmelz sind die höchsten Konzentrationen nahe der Oberfläche gemessen worden und sanken steil Richtung Schmelz-Dentin-Grenze. Im Dentin stieg die Fluoridkonzentration tendenziell im spät gebildeten, juxtapulpalem Dentin an. In beiden Geweben war die höchste Konzentration nahe entsprechenden Austauschfläche mit der Umgebung (Schmelzoberfläche: Mundhöhle; Dentin: Pulpa) gemessen worden.



Dia. 7: Kalzium- und Fluoridprofile in einem bucco-lingualen Schliff eines fluorotischen M₃ (Individuum Nr. Sus 13, Knochenfluoridgehalt: 1435 mg/kg Trockengewicht)

Für eine statische Auswertung der Befunde waren die Stichprobengrößen der Rothirsche und Wildschweine zu klein, um aussagekräftige Analysen durchzuführen. Eine tendenzielle Übereinstimmung mit den Ergebnissen der statistischen Analyse der Messungen der Rehe war zu beobachten, weshalb diese Ergebnisse an dieser Stelle präsentiert werden:

Die durchschnittliche Fluoridkonzentration im peripheren (früh gebildeten) Dentin erster Molaren aus fluorotischen Rehgebissen war ungefähr eine Größenordnung niedriger als die Konzentration im juxtapulpalen (spät gebildeten) Dentin (Abb. 8). Der Unterschied in der Fluoridkonzentration zwischen den beiden Bereichen war statistisch signifikant ($z = 2,52$, $P = 0,012$). Im Gegensatz dazu gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Bereichen der vierten Prämolaren ($z = 0,56$, $P = 0,58$) und der dritten Molaren ($z = 0,42$, $P = 0,67$) in fluorotischen Gebissen (Tab. 5). Die Verhältnisse der maximalen Fluoridkonzentrationen gemessen im juxtapulpalen Dentin zu den maximalen Konzentrationen im peripheren Dentin waren 1,26:1 für den P₄, 1,20 :1 für den M₃ und 6,37:1 für den M₁ (Tab. 5).

Zwischen den juxtapulpalen Bereichen des Dentins der drei untersuchten Zähne gab es keine signifikanten Unterschiede in der Fluoridkonzentration ($\chi^2 = 0$, $df = 2$, $P = 1$), wohingegen es im peripheren Dentin signifikante Unterschiede gab ($\chi^2 = 9,25$, $df = 2$, $P = 0,0098$) (Tab. 5). Der Post-Hoc Test lässt einen signifikanten Unterschied zwischen dem P_4 und dem M_1 erkennen ($z = 2,52$, $P = 0,012$), der Unterschied zwischen dem P_4 und dem M_3 ($z = 0,14$, $P = 0,89$) war nicht signifikant. Die Anwendung des Bonferroni α -Korrektur zeigte ebenfalls einen Unterschied in den Fluoridkonzentrationen des peripheren Dentins zwischen dem M_1 und dem M_3 obwohl dieser zwar deutlich war, war er nicht signifikant ($z = 2,24$, $P = 0,025$).

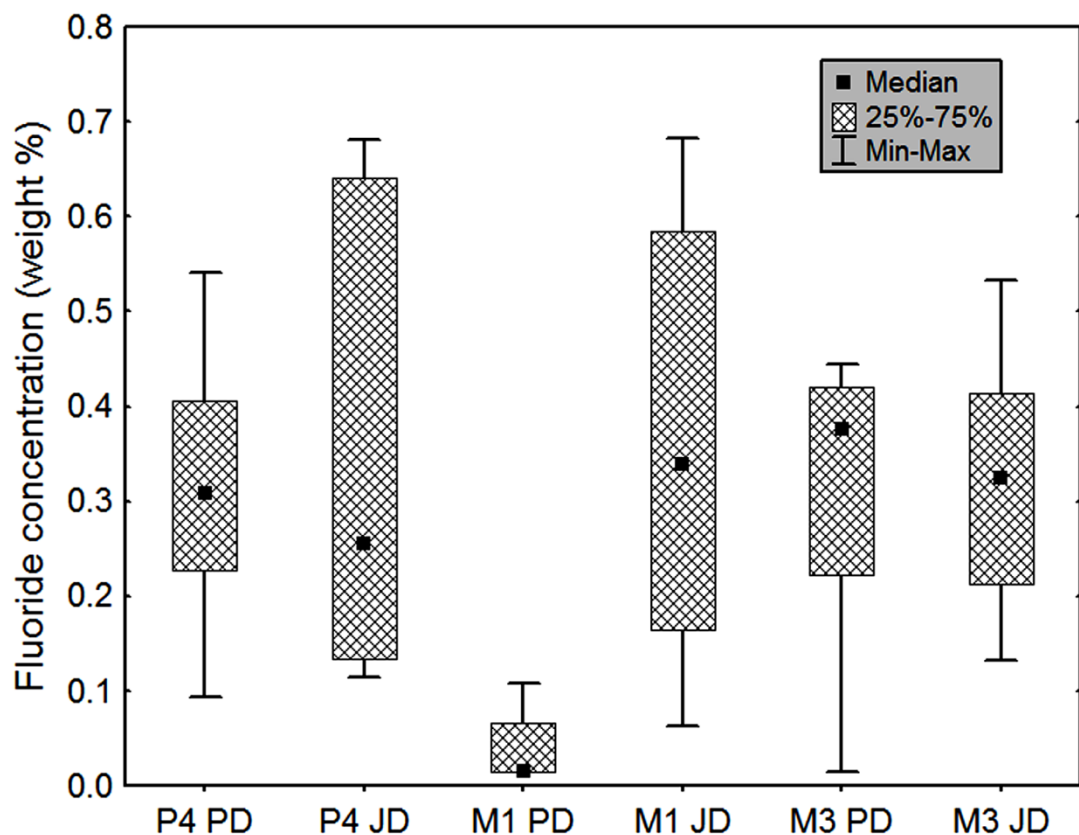


Abb. 8: Vergleich der Fluoridkonzentrationen der untersuchten Rehzähne im peripheren Dentin (PD) und juxtapulpalen Dentin (JD)

Proben #	Kontrolle/ Fluorotisch	Alter (Jahren)	Knochen- fluoridgehalt (mg F⁻/kg Trockengewicht)	DLI (Zahn scores für P₄, M₁, M₃)
Ca 42	Kontrolle	1	149	0 (0, 0, 0)
Ca 38	Fluorotisch	1	1686	21 (5, 0, 5)
Ca 37	Fluorotisch	3	2965	20 (5, 0, 5)
Ca 01	Fluorotisch	4	2786	17 (4, 0, 5)
Ca 24	Fluorotisch	4	1755	21 (5, 0, 5)
Ca 36	Fluorotisch	4	3790	13 (3, 0, 4)
Ca 39	Fluorotisch	4	3591	22 (5, 0, 5)
Ca 41	Fluorotisch	5	3340	20 (5, 0, 5)
Ca 30	Fluorotisch	8	3634	20 (5, 0, 5)
Ro 27	Kontrolle	4	323	0 (0, 0, 0)
Ro 3	Fluorotisch	4	2618	15 (2, 1, 4)
Ro 9	Fluorotisch	4	3014	20 (5, 0, 3)
Ro 17	Fluorotisch	6	2933	16 (3, 0, 3)
Ro 69	Fluorotisch	6	2262	19 (3, 1, 4)
Ro 77	Fluorotisch	6	1883	14 (4, 0, 2)
Ro 8	Fluorotisch	7	3411	24 (5, 2, 4)
Ro 75	Fluorotisch	9	1719	19 (4, 0, 4)
Sus 43	Kontrolle	2	181	---
Sus 9	Fluorotisch	2	859	---
Sus 11	Fluorotisch	3	969	---
Sus 13	Fluorotisch	6	1435	---

Tab. 4: Geschätztes Alter, Knochenfluoridgehalt der Mandibel, DLI und individueller Zahn score (Reh und Rothirsch) der drei analysierten Zähne von Reh (Ca), Rothirsch (Ro) und Wildschwein (Sus)

Zahn	Bereich im Dentin	Fluoridkonzentration (Gew %)			
		Mittelwert	Median	SD	Verteilung
P₄	peripher	0.315	0.309	0.140	0.093 – 0.541
	juxtapulpal	0.357	0.255	0.257	0.114 – 0.681
M₁	peripher l	0.039	0.015	0.037	0.015 – 0.107
	juxtapulpal	0.365	0.339	0.233	0.063 – 0.682
M₃	peripher l	0.312	0.376	0.156	0.015 – 0.445
	juxtapulpal	0.321	0.325	0.137	0.133 – 0.533

Tab. 5: Fluoridkonzentrationen im peripheren (schmelznahem) und juxtapulpalem Dentin mandibularer Backenzähne fluorotischer Gebisse des Europäischen Rehes (n=8)

6. Diskussion

6.1. Fluor

Fluor ist ein Element der 7. Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente und gehört zu den Halogenen. Den Halogenen fehlt genau ein Elektron zum Erreichen der Edelgaskonfiguration, das Fluoratom hat zusätzlich den kleinsten Atomdurchmesser dieser Hauptgruppe. Damit hat Fluor die höchste Elektronegativität aller Elemente und es ist das stärkste bekannte Oxidationsmittel. Es reagiert prompt mit seiner Umgebung und kommt deshalb nicht als elementares oder freies Fluor vor. Gasförmiges F_2 ist aufgrund der Reaktionsfähigkeit von Fluor nicht stabil und bildet Verbindungen. Die wichtigsten natürlichen Vorkommen (von 150 bekannten Mineralen die Fluorid enthalten) sind Fluoride in Form von Flussspat (CaF_2), Kryolith ($Na_3(AlF_6)$) und Fluorapatit ($Ca_5(PO_4)_3F$) (Mortimer, 1996). Der Einfluss von aus Gesteinen ausgewaschenem Fluorid auf die menschliche Gesundheit ist beschrieben (WHO 2002). Demnach sind vor allem in Gebieten, in denen durch Auswaschung von Fluorid aus Gesteinen erhöhte Konzentrationen im Trinkwasser zu finden sind, Skelett- und Dentalfluorose gehäuft zu diagnostizieren. In bestimmten Regionen (z.B. China, Indien, Afrika) ist diese natürlicherweise vorkommende erhöhte Fluorid-Exposition verantwortlich für das Auftreten von Dental- und Osteofluorose beim Menschen.

Weitere Ursachen für toxische Fluoriddosen in tierischen und menschlichen Organismen sind Emissionen anthropogenen Ursprungs. So entstehen in industriellen Prozessen fluoridhaltige Verbindungen in festem, flüssigem und gasförmigem Aggregatzustand (WHO 2002). Genaue Daten über die Mengen anthropogener Fluoridemissionen sind limitiert, Valach (1990) schätzt für das untersuchte Gebiet im nordböhmischen Braunkohlerevier in den 1980er Jahren eine jährliche durchschnittliche Fluoridemission von ca. 12.000 Tonnen aus der Verbrennung von Braunkohle. Folge dieser Emissionen sind u.a. Veränderungen der Flora und Fauna im Gebiet der Deposition von fluoridhaltigen Verbindungen. Der Kausalzusammenhang zwischen Emission und Dentalfluorose bei wildlebenden Cerviden wurden z.B. von Karstad (1967), Kierdorf H et al. (1996a+b), Kierdorf U (1988) Kierdorf U et al. (1989, 1991, 1993, 1994, 1996, 2000), Schultz et al. (1998), Suttie et al. (1985, 1987) und Vikøren & Stuve (1996) beschrieben. Vor allem die Arbeiten von Kierdorf H und Kierdorf U stellen die Bedeutung freilebender Cerviden

als Bioindikatoren in den Vordergrund. Vergleichbare Befunde für Wildschweine sind vorhanden (Kierdorf H et al. 2000). Quellen der Emissionen sind unter anderem die Produktion phosphathaltiger Düngemittel, Aluminiumhütten, oder Braunkohlekraftwerke, die schwefel- und fluoridhaltige Braunkohle verfeuern. Die Aufnahme von Fluoriden erfolgt über Stäube, die auf Oberflächen pflanzlicher Nahrung deponiert sind. Eine signifikante Aufnahme von Fluorid in Pflanzen über die Wurzel in Gebieten mit erhöhter Fluoridemission ist nicht beschrieben. Fluorid, welches durch Wasser- oder Luftverschmutzung in Böden gelangt, wird von den Bodenpartikeln gebunden (Fejerskov et al. 1996). Zemek et al (2006) haben die räumliche Verteilung von Dentalfluorose bei Rehen im Umkreis von Braunkohlekraftwerken des nordböhmischen Reviers untersucht und das Auftreten von Fluorose bei den untersuchten Rehen war korreliert mit der Nähe des untersuchten Gebietes zu einem Kraftwerk. In der Untersuchung wurden weitere Umweltfaktoren berücksichtigt. Die Signifikanzen stiegen unter Einbezug von Kategorien der Waldschäden und am höchsten waren sie unter Einbezug der Schwefeldeposition (sowohl nass als auch trocken). Eine erhöhte Schwefeldeposition kann auch als Zeiger für eine simultane Fluoridimmission angesehen werden.

Die Auswirkungen von Fluorid auf den (Säugetier-) Organismus sind vielfältig. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften beeinflusst Fluorid insbesondere die Prozesse der Biomineralisation (Whitford 1996), was ein Monitoring erleichtert. 99 % des im Körper befindlichen Fluorids ist in den mineralisierten Hartgeweben gebunden.

Studien können z.B. an Material aus dem normalen Jagdbetrieb durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Umbauprozesse (z.B. im Vergleich zum Knochen) sind die Zahnhartgewebe besonders geeignet, um Aussagen über die Chronologie von Fluoridbelastungen treffen zu können. Die Symptome einer Fluoridintoxikation sind auf verschiedenen Ebenen (makroskopisch, mikroskopisch und elementaranalytisch) im vorrangegangenen Kapitel beschrieben worden. Für die Diskussion der Ergebnisse ist an dieser Stelle ein kurzer Überblick über den Metabolismus von Fluorid im Körper notwendig

6.2. Fluoridmetabolismus im Säugetierkörper

Die Aufnahme von Fluorid erfolgt hauptsächlich über den Verdauungstrakt, auch schon über die Mundschleimhaut. Der Hauptanteil Fluorid wird in fester oder gelöster Form verschluckt und über den Intestinaltrakt ins Plasma aufgenommen. Inhalation von HF oder von an Partikeln gebundenem Fluorid sind weitere Möglichkeiten der Aufnahme. Der Übergang ins Plasma erfolgt sehr schnell. Eine oral applizierte Natriumfluoridlösung kann schon Minuten nach dem Schlucken durch erhöhte Fluoridkonzentration im Plasma nachgewiesen werden (Ekstrand et al. 1977). In den meisten experimentellen Studien (siehe unten) wird ein rapider Anstieg des Plasmafluoridlevels nach oraler Fluorid-Applikation beschrieben. Nach ca. 30 Minuten, je nach Medium mit dem Fluorid aufgenommen wird, ist die Hälfte der applizierten Lösung bereits als Fluorid im Plasma nachzuweisen. In Wasser gelöstes Fluorid wird nahezu vollständig absorbiert, als Feststoff aufgenommenes Fluorid wird eher als NaF denn als CaF_2 absorbiert. Selbst bei in Knochenmehl gebundenem und appliziertem Fluorid liegt die Absorptionsrate über 50%. Die Lösung des Fluorids vom Feststoff und die damit verbundene Aufnahme des Fluorids in das Plasma werden durch ein saures Milieu im Intestinaltrakt begünstigt. Die Unterdrückung der gastrischen Säuresekretion vermindert die Aufnahme von Fluorid in das Plasma (Whitford 1996).

Im Plasma gibt es zwei Formen von Fluorid, eine ionische (oder auch anorganische oder freie Fraktion) und eine nichtionische Fraktion (organische oder gebundene Fraktion). Die ionische Fraktion ist von Bedeutung in der (Zahn-) Medizin. Sie kann im frischen Plasma mit der Fluorid-Elektrode gemessen werden und ist nicht an Plasmaproteine gebunden. Die nichtionische Form, deren Anteil am gesamten Plasmafluoridgehalt der Größere ist, ist zusammengesetzt aus diversen fettlöslichen organischen Fluorverbindungen. Diese sind mit der Fluorid-Elektrode nicht nachweisbar, sofern das Plasma nicht thermisch aufbereitet ist. Die biologische Bedeutung der nichtionischen Fraktion ist nicht bestimmt, diese Fraktion geht Bindungen mit Plasmaproteinen ein. Zwischen den beiden Fraktionen findet geringer bis kein Austausch statt. (Whitford 1996).

Ein großer Teil des Fluorids im Plasma wird in den Knochen des Organismus eingebaut, wo ca. 99% der Gesamtmenge deponiert sind. Im Knochen substituiert Fluorid die Hydroxylgruppen des Hydroxylapatit. Der Einbau in den Knochen kann über radioaktiv markiertes Fluorid verfolgt werden, der Einbau erfolgt innerhalb

weniger Minuten nach Injektion von Fluorid ins Plasma. Nur sehr geringe Mengen Fluorid werden in Weichgeweben aufgenommen, ein weiterer Teil wird über die Nieren ausgeschieden (Fejerskov et al. 1996).

Von Interesse ist die Frage, ob eine Weitergabe von Fluoriden über die Plazenta an einen Fetus möglich ist. Zumindest im menschlichen Organismus stellt die Plazenta keine Barriere dar (Fejerskov et al. 1996). Bei den Artiodactyla, speziell den Cerviden, Boviden und den Schweinen zeigen die Befunde, dass die Plazenta für Fluorid nicht oder kaum durchlässig ist. Intrauterin bzw. während der Laktationsphase gebildete erste Molaren von Cerviden (Kierdorf U und H 2000) und Schweinen (Kierdorf H et al. 2000) sind makroskopisch nahezu frei von Fluorose. Die eigenen Befunde zeigen, dass Dentin der ersten Molaren, welches zeitgleich mit dem Schmelz gebildet wurde, ebenfalls frei von Veränderungen ist.

Der plazentale Transfer von Fluoriden in Rindern wurde von Shupe (1992) bestimmt. Ein signifikanter Transfer von der Kuh zum Fetus konnte nicht festgestellt werden. Eine Erklärung für den Unterschied zwischen dem plazentalen Transfer bei Mensch und Artiodactyla ist im Aufbau der Plazenta zu suchen. Enders (1965) unterscheidet die Plazenta der Artiodactyla von der des Menschen (Tab. 2). Die Plazenta der Artiodactyla ist vom epithelio-chorialen Typ (Placenta epitheliochorialis), die des Menschen vom haemo-monochorialem Typ (Placenta haemomonochorialis). Bei der Placenta epitheliochorialis sind zwischen mütterlichem Blut und dem Fetalkreislauf keine Gewebe aufgelöst, d.h. mütterliches Blutgefäßendothel, Uterusepithel, Chorionepithel und fetales Blutgefäßendothel samt ihrer Basalmembranen stellen eine Diffusionsbarriere für Fluorid dar, wohingegen bei der Placenta haemomonochorialis das Uterusepithel des Endometriums und das Gefäßendothel aufgelöst sind. Das Chorionepithel des Fetus grenzt direkt ans mütterliche Blut. Während der postnatalen Stillzeit ist das Junge vor Fluoriden aus der Umwelt geschützt, da ein Transfer von Fluorid vom Plasma in die Muttermilch ausgeschlossen wird (Ekstrand et al. 1981, Moudgil 1982).

	Implantation	Placenta, äußere Form	Placenta funktionelle Aspekte
Cervidae	zentrale Implantation	Placenta multiplex/Placen ta cotyledonaria	Placenta epitheliochorialis
Schwein	zentrale Implantation	Placenta diffusa	Placenta epitheliochorialis
Mensch	Interstitielle Implantation	Placenta discoidalis	Placenta haemomonochorialis

Tab. 6: Plazentatypen (nach Enders 1965)

6.3. Auswirkungen von Fluorid auf die Amelogenese

Generell ist die Zufuhr von Fluorid für den Organismus ein Stressfaktor, der sich negativ auf die Funktion der Bildungszellen von Hartgeweben auswirkt. Zu unterscheiden ist zwischen akuter (meist einmaliger) Überdosierung und chronischer Überdosierung. Eisenmann und Yaeger 1969 beschreiben – neben weiteren Ionen – die Auswirkungen einer einzelnen Fluoridgabe auf die Bildung der Zahnhartgewebe und prägen den Begriff der „Kalzio-traumatischen Antwort (calcio-traumatic response)“. Für ihre Versuche nehmen Eisenmann und Yaeger Ratten als Modellorganismen. Fluorid erzeugt deutliche Veränderungen im Schmelz. Hauptsächlich sind Hypomineralisierungen entlang der Mineralisierungsfront zu erkennen, bei akuter Überdosierung werden teilweise auch Hypermineralisierungen beobachtet.

Fejerskov et al. (1979) untersuchen vergleichend die Auswirkungen akuter und chronischer Fluoriddosen beim Mensch und bei der Ratte. Dazu untersuchen sie Dünnschliffe von Inzisiven der Ratte sowie Inzisiven und Molaren des Menschen mithilfe der Mikroradiographie. Akute Dosen erzeugten Hypermineralisierungen gefolgt von Hypomineralisierungen sowohl im Schmelz als auch im Dentin. Chronische Belastungen hingegen erzeugten extensive Hypomineralisierungen ohne das Auftreten von Hypermineralisierungen. Hypermineralisierungen im Bereich von Mineralisierungsdefekten, wie sie von Rojas-Sanchez et al (2007) für das Dentin und

den Schmelz beschrieben werden, sind in der vorliegenden Studie nicht zu beobachten.

Viera et al. (2005) stellen die Hypothese auf, dass genetische Faktoren und Umweltfaktoren Einfluss auf die Ausprägung der Dentalfluorose haben. Ihre Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass der Grad der Dentalfluorose selten stark korreliert ist mit dem Fluoridgehalt der untersuchten Zähne. Zähne mit gleichem Fluoridlevel zeigen unterschiedlich ausgeprägte Dentalfluorose. Viera et al. vergleichen dazu drei unterschiedliche Stämme von Labormäusen, die experimentell nachgewiesen unterschiedlich anfällig für Dentalfluorose sind. Verglichen werden Grad der Dentalfluorose, Fluoridgehalte und die Materialeigenschaften der Zähne. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass Umweltfaktoren und genetische Faktoren positiv korrelieren mit der Ausprägung von Dentalfluorose. Die Auswirkungen auf die Mineralisierung eines Zahnes sind nicht korreliert mit genetischen, aber mit Umweltfaktoren.

Sharma et al (2008) stellen in Ameloblasten fest, dass Fluorid im Endoplasmatischen Retikulum Stress erzeugt, welcher sich negativ auf die Proteinbiosynthese auswirkt. Marker für diesen Stress ist der „unfolded protein response (UPR)“. Die Folge hoher Fluoriddosen ist die Auslösung von Apoptose. Sharma et al konnten einen linearen Bezug zwischen Fluoriddosis und UPR herstellen. Einher geht dies mit verminderter Sekretion des SEAP (secreted alkaline phosphatase) in vitro.

6.4. Auswirkungen von Fluorid auf die Dentinogenese

Die Befunde Fluorid-induzierter Störungen der Dentinogenese bei Cerviden und Suiden sind verstärkt auftretende ALPI's und assoziiertes Interglobulardentin. Mit Mikroradiographien lassen sich hypomineralisierte Banden entlang der Mineralisierungsfront nachweisen. Diese Befunde sind stark korreliert mit Störungen der Amelogenese, welche an der Schmelzoberfläche die beschriebenen makroskopischen Befunde mit sich bringen.

Robinson et al. (2004) fassen die Auswirkungen von Fluorid auf die Entwicklung des Zahnes zusammen und stellen dabei einen Unterschied zwischen der Detektierbarkeit der Zahnfluorose in Schmelz und Dentin fest. Im Dentin sei die Auswirkung von Fluorid erst bei wesentlich höheren Fluoriddosen zu erkennen, als im Schmelz. Diese Aussage lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht stützen, auch geringer

belastete Individuen zeigen Veränderungen im Dentin. Möglicherweise sind die Konzentrationen, von denen Robinson et al. schreiben noch weit unter denen der vorliegenden Studien und somit ist mit den vorliegen Ergebnissen diese Aussage nicht zu überprüfen. Eine plausible biologische Erklärung für ihre Aussagen bleiben Robinson et al schuldig.

Appleton (1992, 1994) vergleicht die Auswirkungen von Fluoridionen auf die Bildung der Inzisiven von Ratten. Nach akuter, einmaliger Injektion (Appleton 1992) gab es eine „Kalzio-traumatische Antwort (calcio-traumatic response)“. Appleton stützt die Ergebnisse von Eisenmann und Yaeger (1969) mit höherer Auflösung des REM im BSE-Modus. Der Grund für Hypermineralisierungen ist eine vorübergehende Steigerung der Mineraleinlagerung ins Dentin aufgrund lokaler erhöhter Fluoridkonzentration, welche zu einer beschleunigten Aufnahme von Kalziumionen führt. Eine auf die Hypermineralisierung folgende hypomineralisierte Bande deutet auf eine sich hieraus ergebende kurzfristige Verringerung der lokalen Kalziumkonzentration hin.

Bei chronischer Zufuhr von Fluoridionen mit der Nahrung ist die Reaktion des Dentins konzentrationsabhängig (Appleton 1994). Bei geringen Konzentrationen gibt es Akzentuierungen der inkrementellen Linien, bei höheren Konzentrationen entsteht Interglobulardentin.

Befunde für das Dentin von fluorotischen Rehzähnen sind bei Kierdorf U et al. (1993) vorhanden, der Fokus dieser Arbeit liegt aber auf dem Zahnschmelz. Vermehrtes Auftreten von Interglobulardentin und eine Akzentuierung der Inkrementlinien im Dentin werden dennoch beschrieben. Erklärungen für die limitierte Beschreibung können methodischer Art sein. Unterschiedliche Belichtungszeiten in der Mikroradiographie bei verschiedenen röntgendichten Materialien (Schmelz und Dentin) sind notwendig. Weitere Ausführungen dazu sind der Methodenkritik der vorliegenden Arbeit zu entnehmen.

Eine Beschreibung des Dentins fluorotischer Rothirsche gibt es von Appleton et al. (2000). In dieser Arbeit wurden mit der Rasterelektronenmikroskopie sowohl im primären, als auch im sekundären Dentin Hypomineralisierungen und vermehrtes Auftreten von Interglobulardentin beobachtet. Der Fokus der Arbeit lag aber auf der Beschreibung von Riesenkanälchen im Dentin. Nicht durchgebrochene Zähne zeigten Riesenkanälchen mit großem Lumen, dessen Ränder hypomineralisiert waren und Kalkospheriten zeigten. Je nach Stärke der Fluoridexposition war das okklusale

Ende dieser Riesenkanälchen in stark abgenutzten Zähnen mit einem Mineral verschlossen, welches stärker mineralisiert war, als das intertubuläre Dentin. Appleton et al. diskutieren, ob diese Form der Sklerotisierung eine direkte Folge des Flourideinflusses auf die Dentinbildung ist, oder ob der Stimulus eine vermehrte Abnutzung der fluorotischen Zähne ist.

Die beschriebenen makroskopischen und mikroskopischen Defekte in Schmelz und Dentin sind Symptome einer komplexen Wirkungsweise des Fluorids auf den Organismus und die Hartgewebsbildung. Einhergehend mit der Beeinträchtigung der Ameloblasten und Odontoblasten gibt es systemische Effekte, die sich negativ auf die Odontogenese auswirken. Appleton (1995) hat nachgewiesen, dass akute Fluoriddosen Einfluss auf die Ionenbalance des Plasmas haben. Intraperitoneal in Ratten appliziertes Natriumfluorid sorgt in kürzester Zeit für einen rapiden Schwund von freien Kalziumionen aus dem Plasma. Das Resultat ist der „Calcio-traumatic-response“ (s.o.), eine lokale Hypermineralisierung, gefolgt von einer Hypomineralisierung. Appleton folgert aus dieser Studie, dass Veränderungen der Bildung und Struktur des Dentins (Hypomineralisierungen), welche er in früheren Studien nachgewiesen hat (Appleton 1988, 1992, 1993), eine direkte Folge des Schwundes von Kalziumionen im Plasma sind. Appleton bestätigt mit seiner Arbeit die Ergebnisse von Monsour et al (1989), die mit ultrahistochemischen Methoden (Kalium-Pyroantimonat-Methode) den Schwund von Kalziumionen nach Fluoridinjektion im Bereich der sekretorischen Ameloblasten von Ratten nachgewiesen haben. Gleichzeitig erlaubt diese Methode, den Weg des Kalziums zwischen den Ameloblasten zum Schmelz zu verfolgen.

Fluorid wirkt auf der Ebene der physiologischen und biochemischen Prozesse der Odontoblasten. Mit den Methoden der vorliegenden Arbeit sind nur die Symptome dieser Wirkung zu erfassen. So hat Fluorid z.B. Einfluss auf die Genexpression von Odontoblasten, auf Enzymkaskaden des Sekretionsprozesses von Odontoblasten (und den beteiligten Zellorganellen) und somit auf die Struktur der von den Odontoblasten durch Exocytose ausgeschiedenen Proteoglykane. Die Ergebnisse entsprechender, meist *in vitro* durchgeführten Studien können herangezogen werden, um die vorliegenden Ergebnisse zu erklären:

Niedrige Dosen von NaF haben im Zellkulturexperiment Einfluss auf die Genexpression der Odontoblasten (Wurtz et al. 2008). Eine 1 mM NaF Lösung

verändert die Genexpression, ohne Einfluss auf die Zellproliferation zu nehmen. Zellorganellen sind nicht beeinträchtigt. Die Konzentration von RNA, die extrazelluläre Matrixproteine Asporin und Fibromodulin, und membranassoziierte Proteine Periostin und IMT2A codieren, war zehnfach reduziert. Signalfaktoren codierende RNAs waren bis zu einem Drittel gegenüber Kontrollen reduziert. Bei der Gabe 3 mM Lösung NaF waren nekrotische Veränderungen der Zellen evident. Diese Zellen proliferierten nicht weiter und beteiligten sich nicht weiter an der Synthese. Die Studie von Wurtz et al (2008) demonstriert, das Fluorid in geringen Dosen, die keine Stressreaktionen oder Apoptose der Odontoblasten hervorrufen, nachhaltig den Prozess der Transkription in den Odontoblasten beeinflussen kann und damit die Sekretion der Dentinmatrix beeinträchtigt.

Milan et al. (1999) stellten fest, das Dentin Phosphoprotein (DPP), ein nicht-kollagenes Matrixprotein, unter Einfluss von Fluorid *in vivo* eine veränderte Phosphorylierung durchmacht, was sich auf die nachfolgende Mineralisierung auswirkt. *In vitro* haben Milan et al. (2001) die Aktivität des Enzymkomplexes gemessen, der für die Phosphorylierung des DPP zuständig ist. Die Aktivität von Kasein Kinase II ist ab einer Konzentration von 0,04 M NaF vollständig gehemmt, bei geringeren Konzentrationen war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms signifikant herabgesetzt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, welche das DPP nach dem Einbau in die Matrix wieder dephosphoryliert, um u.a. anorganisches Phosphat an der Mineralisierungsfront bereitzustellen, ist ab einer Konzentration von $0,09 - 9 \times 10^{-8}$ M NaF gehemmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Alkalischen Phosphatase war signifikant gehemmt bei einer Konzentration von 0,09 M NaF. Milan et al. halten die Veränderung des Enzymkomplexes für eine plausible Erklärung für fluorotische Mineralisierungsmuster im Dentin. Moseley et al. (2003) untersuchen ebenfalls den Einfluss von Fluorid auf Odontoblasten und deren sekretorische Aktivität. Die Morphologie der Odontoblasten bleibt auch bei einer Konzentration von 6 mM NaF unverändert. Die Synthese von Kollagen, welche mittels Autoradiographie erfasst wurde, wurde bei der gleichen Konzentration behindert. In den Fibroblasten der Zahnpulpa haben Veron et al. (1993) ähnliche Einflüsse auf die Aktivität der Zellen *in vitro* gemessen. Die Sekretion von Kollagen und die Aktivität von alkalischer Phosphatase gehen mit ansteigender Fluoriddosis zurück.

Eine weiterer wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix sind die Proteoglykane. Milan et al. (2004) beschreiben die Funktion der Proteoglykane in der Prädentinmatrix und deren chemische Strukturveränderung beim Übergang zum Dentin. Proteoglykane der Dentinmatrix zeigen eine signifikant höhere Affinität für Hydroxylapatit als Proteoglykane der Prädentinmatrix. Milan et al. haben die Glykosaminoglykane der Proteoglykane des Dentin entfernt und gezeigt, dass mit der Entfernung die erhöhte Affinität für Hydroxylapatit wieder verloren geht. Waddington et al. (2004) weisen nach, dass Fluorid (6 mM NaF in vitro) genau diese Glykosaminoglykanketten in ihrer Länge reduziert, sowohl im Dentin, als auch im Prädentin. Zusätzlich reduziert Fluorid die Sulfatierung der Glykosaminoglykanketten. Für Knochen wurde diese Reduktion der Glykosaminoglykanketten unter Einfluss von Fluorid ebenfalls nachgewiesen (Waddington & Langley, 1998).

Neben der organischen Matrix ist auch die Struktur des anorganischen Anteils der Hartgewebe von einer Dentalfluorose betroffen. Durch Zugabe von Fluorid ändern sich Morphologie und Größe des Apatitkristalls. Eanes und Hailer (1998) haben Apatitkristalle aus Knochen unter physiologischen Bedingungen gezüchtet und festgestellt, dass die Kristalle anisotropisch größer werden, wenn Fluorid in die Wachstumslösung appliziert wird. Hauptsächlich im Durchmesser nehmen die Kristalle zu, nicht aber in der Länge.

Eine positive Korrelation zwischen Kristallgröße und der Aufnahme von Fluorid beschreiben Viera et al. (2003). Sie untersuchten die Apatitkristalle aus Zähnen von Menschen, die durch das Trinkwasser chronisch erhöhten Dosen Fluorid ausgesetzt waren. Die Apatitkristalle waren signifikant vergrößert. Die mechanischen Eigenschaften fluorotischer Zähne werden durch vergrößerte Apatitkristalle jedoch verschlechtert (Mahoney et al. 2004).

Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind neben der Beschreibung der Symptome chronischer Fluoridbelastung auch die Messungen der Elemente Kalzium und Fluorid. In den Proben wurden entlang Profilen von der Schmelzoberfläche bis zur Pulpa im bucco-lingualen und mesio-distalen Schliff entsprechende Messprofile untersucht. Diese Messprofile zeigen charakteristische Verläufe, die bei fluorotischen Zähnen im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Fluoridwerte darstellen. Diese erhöhten Fluoridwerte sind in Zähnen, die postnatal bzw. nach der Laktationsphase gebildet worden sind (P₄ und M₃) sowohl im Schmelz, als auch im

gesamten Dentin erhöht. Intrauterin gebildete Zähne (M_1) zeigen nur an der Schmelzoberfläche und in dem nach der Laktationsphase gebildeten Dentin erhöhte Fluorid-Werte. Dieser Abschnitt des Dentins zeigt auch in ersten Molaren die typischen beschriebenen Mineralisationsdefekte, wohingegen im Dentin mit geringer Fluoridkonzentration und im Schmelz keine Mineralisationsdefekte zu beobachten sind.

Weatherell et al. (1977) erstellen solche Messprofile, um die Aufnahme von Fluorid im Schmelz während der Amelogenese zu rekonstruieren. Die erzeugten Profile stimmen mit den eigenen Ergebnissen für die Messung im Schmelz überein. Die Erklärung von Weatherell et al. für die maximale Fluoridkonzentration an der Schmelzoberfläche kann auch auf das Dentin übertragen werden: Die maximalen Fluoridwerte an den Oberflächen (Schmelz und Pulpa) sind das Resultat der Diffusion von Fluorid aus dem Medium der Mundhöhle bzw. Plasma in das Hartgewebe. Einerseits wird bei chronisch belasteten Tieren mit der Nahrung oder dem Trinkwasser ständig Fluorid an die Schmelzoberfläche verbracht, andererseits haben chronisch belastete Tiere einen erhöhten Fluoridspiegel im Plasma. Wie oben beschrieben, kommt es an diesen Grenzflächen in der Bildungsphase zu vermehrtem Einbau von Fluorid in das Hydroxylapatitmolekül. Im reifen Schmelz kommt es zusätzlich zur Substitution von Hydroxylgruppen durch Fluorid, welche durch die posteruptive Schmelzveränderung und damit einhergehender verstärkter Porosität der Schmelzoberfläche begünstigt wird.

Nelson et al (1989) erzeugten in eruptierenden Inzisiven von Schafen durch chronische Fluoridgabe in verschiedenen starken Dosen leichte bis starke Anzeichen von Fluorose. Schliffe dieser Zähne wurden mit einer Protonen-Sonde untersucht und labio-linguale Profile von der Schmelzoberfläche zur Pulpa wurden erstellt. Die erzeugten Profile stimmen überein mit den eigenen Ergebnissen. Mit gesteigerter applizierter Fluoriddosis nimmt die Konzentration im Profil signifikant zu. Vergleichbare Ergebnisse berichten auch Richards et al. (1994). Bei ihren Untersuchungen wurden die Ergebnisse der Protonen-Sonde mit den Ergebnissen einer Säure-Ätztechnik verglichen. Die Messungen wurden im Schmelz fluorotischer Schweine durchgeführt. Die Profile für den Schmelz gleichen denen der eigenen Messungen, Dentin wurde von diesen Autoren nicht untersucht. Nelson et al. Heben den Vorteil der Säure-Ätztechnik hervor, da mit dieser Technik entlang des gesamten Profils gemessen wurde, wohingegen die Protonen-Sonde punktuelle Messungen

entlang eines definierten Profils erstellt, die Zwischenräume dieser Messungen aber nicht berücksichtigt werden.

Die Kombination beider Methoden, die Beschreibung der Symptome im Dentin und die Messung der Fluoridkonzentration im Dentin erlauben Aussagen über die Chronologie einer Fluoridbelastung während der Lebenszeit eines Individuums. Ein Individuum, welches sein gesamtes Leben in einem fluorid-belasteten Habitat verbracht hat, wird einen entsprechend hohen Knochenfluoridgehalt aufweisen (als Reflexion der lebenslangen Inkorporation von Fluorid in das Skelett). Ebenso wird ein solches Individuum entsprechende Veränderungen im Schmelz und Dentin solcher Zähne zeigen, die nach der Entwöhnung gebildet wurden. Ein Individuum, welches zwar einen hohen Knochenfluoridgehalt zeigt, aber keine Dentalfluorose im Schmelz, kann nach der Amelogenese der permanenten Dentition in ein Fluorid belastetes Gebiet eingewandert sein. Trotzdem zeigt das Dentin eines solchen Tieres im inneren, spät gebildeten Anteil Veränderungen, welche durch Fluorid verursacht sind. Die Untersuchung struktureller Veränderungen des Dentins zusätzlich zur Untersuchung fluorotischer Defekte des Schmelzes erweitert somit das Zeitfenster zur Analyse der fluorid-induzierten Effekte auf die Zahnbildung. Die zeitliche Abfolge der Fluorid-Exposition eines Individuums wird detaillierter dargestellt, als bei reiner Betrachtung des Schmelzes. Diese Erweiterung des zu untersuchenden Zeitfensters kann wichtig sein, wenn es hohe Variationen der Fluoridbelastung gibt, wie z.B. in der Nähe punktueller Fluorid-Emittenten (Kierdorf und Kierdorf 2002). Die Verteilung der fluorotischen Defekte im Dentin lässt auf eine variierende Beeinflussung der Dentinogenese schließen. Dies führt zu der Hypothese, dass eine Anzahl verschiedener Faktoren (Umweltfaktoren und Tier-bezogene Faktoren) Einfluss auf die Veränderung des Dentins hat. Somit variiert die Fluorid-Belastung mit der saisonal varrierenden atmosphärischen Deposition von Fluorid und den Wachstumsraten der Vegetation. Tier-bezogene Faktoren die berücksichtigt werden müssen sind saisonal variierende Verhaltensmuster, die Anzahl der Futteraufnahmen pro Tag und die Reviergröße, sowie variierende Wachstumsraten und der allgemeine Gesundheitszustand (Kierdorf et al. 1993). Diese externen und internen Faktoren führen zu Fluktuationen im Plasma-Fluorid-Level. Die konzentrationsabhängige Empfindlichkeit der Odontoblasten gegenüber Fluorid in Kombination mit der Fluktuation des Plasmafluoridlevels sind die entscheidenden Faktoren für die Verteilung und die Schwere der Defekte im Dentin. Die Appositionsraten des

Dentins variieren merklich während der Lebenszeit eines Zahnes (Dean und Scandrett, 1995, 1996). Iinuma et al. (2004) berichten tägliche Appositionsraten des Dentins von $7,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ (Durchschnitt \pm SD) in ersten Molaren von Sikahirschen (*Cervus nippon*) während der ersten sechs Lebensmonate. Markierungs-Studien zeigen, dass die Raten der Dentin-Bildung und –Mineralisierung beträchtliche Unterschiede zwischen Bereichen des Dentins eines Zahnes aufweisen. Dickere Bereiche des Dentins werden schneller gebildet, als Dünnere (Dean und Scandrett, 1995; Iinuma et al. 2004; Smith et al. 2006). In der vorliegenden Studie wird die Variation der Appositionsraten von simultan gebildetem Dentin durch die variierende Breite der Banden im Dentin mit Mineralisierungsdefekten gezeigt.

Mit der vorliegenden Studie wird demonstriert, dass mit der Analyse des Dentins zusätzlich zur Analyse der Schmelzdefekte das ontogenetische Zeitfenster der Beeinträchtigung der Bildung der Zahnhartgewebe durch Fluorid deutlich erweitert wird. Die Analyse des Dentins (Histologie und Elementanalyse) als weiteres Mittel zur Analyse fluorid-induzierter pathologischer Veränderungen des Zahnes erlaubt eine retrospektive Beurteilung der der Muster einer Fluoridbelastung während der Lebenszeit eines Individuums. Diese Untersuchung unterstützt die Signifikanz der wild-lebenden Paarhufer als Bioindikatoren einer Fluoridverschmutzung.

7. Technische Aspekte und Methodenkritik

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene bildgebende und analytische Verfahren kombiniert, um aus den Proben möglichst viele Informationen über das Dentin zu gewinnen. Es wurden Dünnschliffe angefertigt für die Histologie und die Mikroradiographie, sowie Anschliffe des Dentins für die Mikrosonde und das Rasterelektronenmikroskop. Makroskopisch lassen sich über das Dentin keine Informationen gewinnen, da das Dentin der untersuchten Arten jeweils von Schmelz bzw. Zement überlagert ist.

Zähne sind Komposite verschiedener Materialien (Schmelz, Dentin und Zement), die jeweils relativ spröde sind und beim Auftrennen mit einer Diamantsäge leicht brechen würden. Um dies zu verhindern, werden Hartgewebe in einen Kunststoff oder Kunstharz eingebracht (z.B. Romeis 1989). Zwei Methoden stehen zur Wahl: die Einbettung, wobei die Probe komplett vom Harz durchdrungen wird. Als zweite Methode steht die Einschließung der Probe zur Verfügung, wobei der Harz nur mit den Oberflächen in Kontakt kommt, den Geweben beim Auftrennen aber Stabilität gibt. Zu diesen Oberflächen zählen auch die Pulpahöhle und größere Risse. Für eine Einbettung eignet sich z.B. Biodur E 12 (Biodur Products, Heidelberg), modifiziert nach Schultz (1988, 2001), für die Einschließung Epofix (Struers, Kopenhagen). Bei der Wahl des bevorzugten Mediums sollte darauf geachtet werden, dass der ausgehärtete Harz ähnliche Materialeigenschaften (Härte) wie die Probe selber hat, um beim Dünnschleifen sowohl von der Probe als auch vom Harz gleich viel Material abzuschleifen. Zähne stellen eine problematische Probenart dar, da sie aus drei verschiedenen Materialien bestehen, die unterschiedliche Härten aufweisen (siehe auch „Odontogenese“). Es kann bei der Erstellung eines Schliffes zu Absetzkanten zwischen den verschiedenen Materialien kommen, speziell zwischen dem weicheren Dentin und dem härteren Schmelz lassen sich diese Kanten nicht vermeiden. Biodur E 12 eignet sich besonders für archäologische Proben, die besonders spröde sind oder für Proben, deren Weichgewebe erhalten bleiben sollen. Nachteilig ist die lange Aushärtezeit. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Zähne verwendet, die relativ frisch und kaum porös waren. Die Weichgewebe waren vollständig durch Mazeration entfernt, daher war eine Ummantelung der vorliegenden Proben mit Epofix (Struers, Kopenhagen) ausreichend. Aufgrund der Mazeration konnte auf Schritte zur Entfettung der Proben verzichtet werden.

Die Proben sind nach der Einbettung in medianer, bucco-lingualer bzw. mesio-distaler Achse mit einer Diamantsäge (Woco50, Conrad, Clausthal-Zellerfeld) aufgetrennt worden. Das Auftrennen ist ein destruktiver Prozess, in dem entsprechend der Stärke des Sägeblattes Material der Probe verloren geht. Dabei erschwert der hohe Brechungsindex des Harzes das Treffen der exakten medianen Achse. Teilweise muss bis zum Erreichen dieser Ebene die Probe geschliffen werden. Um einen histologischen Schliff zu erstellen, wird die Schnittfläche unter weiterem Verlust von Probenmaterial plan geschliffen und poliert und nach dem Aufkleben und Abtrennen des überstehenden Blöckchens wird das Präparat dünn geschliffen. Ebenso werden die Proben für die Mikroradiographie behandelt, ohne dass die Probe auf einen Objektträger aufgeklebt wird. Blöckchen für das REM und die Mikrosonde werden oberflächlich geschliffen und poliert. Für jeden Präparationsschritt gehen mehrere Millimeter der Probe verloren, auch wenn die Endstärke der Dünnschliffe maximal 70µm beträgt. Gerade bei den kleineren vierten Prämolaren der Rehe bleibt wenig Material übrig und die Anschliffe für die Mikrosonde oder das REM liegen nicht mehr in der medianen bucco-lingualen Ebene. Falls die Schliffebene zu weit mesial bzw. distal lag und die Pulpa nicht mehr mit dargestellt wurde, wurde (je nach Art des Zahnes) der zweite Höcker eines Zahnes präpariert. Es bleibt festzustellen, dass die Präparation eines Zahnes für die hier angewandten Methoden nur unter Verlust von relativ viel Material ausgeführt werden kann.

Nach Abschluss der Laborarbeit für die vorliegende Arbeit wurde ein neues Verfahren der Hartgewebismikrotomie mittels Femtosekundenlasertechnik entwickelt worden, welches Schnitte < 20µm Dicke erlaubt und ohne vorherige Entkalkungsschritte praktisch verlustfreie Serienschnitte erlaubt (www.rowiak.com).

7.1. Histologie

Die Untersuchung der Dentinmikrostruktur findet in der Regel an ungefärbten Schliffen statt. Um dennoch die Strukturen darstellen zu können wird bei der vorliegenden Untersuchung das Phasenkontrastverfahren angewendet (Zernike 1935 in Romeis 1985). Im gefärbten histologischen Präparat wird an den gefärbten Strukturen mehr Licht absorbiert, als an ungefärbten Strukturen. Das menschliche Auge erkennt die daraus resultierenden Veränderungen der Amplitude als verminderte Helligkeit (Amplitudenpräparat). Das ungefärbte Präparat verändert die

Amplitude kaum, aber die verschiedenen Strukturen liefern durch unterschiedliche Brechungsindizes Phasenunterschiede zwischen Haupt- und Nebenmaxima der Beugung. Durch das Phasenkontrastverfahren werden diese Beugungsmaxima gesteigert und in sichtbare Helligkeitsunterschiede überführt. Verstärkt werden kann dieser Effekt durch den Einsatz eines Blaufilters.

Die Dicke eines nicht entkalkten, histologischen Hartgewebeschliffes muss der Fragestellung angepasst werden. Laut Romeis (1989) sind mit den verwendeten Techniken Schliffe zwischen 50 und 100µm herzustellen. Für dünnere Schliffe muss auf andere Techniken zurückgegriffen werden. Vielfach wird empfohlen für die Untersuchung von inkrementellen Linien auf eine Schliffdicke von 100µm zu präparieren, um mit Summationseffekten inkrementelle Linien deutlicher darzustellen (Fitzgerald 2000). Die optimale Schliffdicke von 70µm für die vorliegenden Untersuchungen wurde näherungsweise durch eine Testreihe ermittelt. In dickeren Präparaten kommt es kaum zu diesen Summationseffekten, mehr noch lassen sich Details des Objektes nicht scharf abbilden. Dentin mit einer Dicke von über 90µm absorbiert zu viel Licht, der Schliff erscheint dunkel. In dünneren Schliffen lässt sich der Verlauf speziell der Dentinkanälchen nur noch schwer verfolgen, insbesondere wenn Owensche Konturlinien darzustellen sind, deren Wellenamplitude über 50 µm liegen.

7.2. Mikroradiographie

Für die Mikroradiographie wurden Schliffe von ca. 70µm angefertigt, die nicht auf einen Objektträger aufgebracht werden. Die Probe wird für eine Belichtung auf den entsprechenden Film aufgelegt. Die optimale Darstellung des Dentins auf den Mikroradiographien muss durch eine Testreihe näherungsweise erprobt werden. Dazu werden Belichtungszeit und –stärke angepasst, bis die Strukturen des Dentins eindeutig dargestellt werden. Die abgebildete Mikroradiographie gibt relative Informationen über den Mineralgehalt der Strukturen; eine standardisierte Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. Die Kompositstruktur des Zahnes macht es schwer möglich die verschiedenen Gewebe eines Zahnes in einer Mikroradiographie gleichzeitig darzustellen. Stärker mineralisierte Gewebe, wie z.B. der Schmelz brauchen wahlweise stärkere oder längere Belichtungen. In Mikroradiographien, die den Schmelz darstellen sollen, ist das Dentin überbelichtet, in den vorliegenden Mikroradiographien des Dentins ist der Schmelz unterbelichtet.

Assoziierte Strukturen im Schmelz und Dentin, welche im histologischen Schliff darstellbar sind, lassen sich daher nicht in einer Mikroradiographie zeigen. Das Auflösungsvermögen von Mikroradiographien ist begrenzt durch die Körnung des Filmes, bei der Betrachtung unter dem Mikroskop wird bei größeren Vergrößerungen die Struktur des Filmes sichtbar.

7.3. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Anschliffe der bucco-lingualen Ebene der Proben hergestellt (s.o.). Das Schleifen und Polieren dieser Proben per Hand mit Siliziumkarbid-Schleifpapieren mit steigender Körnung führt zu nicht ausreichenden Ergebnissen. Im REM erscheint die Oberfläche stark verkratzt. Für das Schleifen und polieren dieser Proben wurde ein Rotor (Labopol 50 Struers, Kopenhagen, Dänemark) verwendet, der mit verschiedenen Scheiben kombiniert mit Diamantsuspensionen absteigender Korndurchmesser angewendet wird. Als finale Polierstufe wurde ein Poliertuch mit einer OP-S Kolloidal Silica Suspension angewendet, die letzte Unebenheiten der vorhergehenden Schritte entfernt hat. Die Suspension besteht aus kolloidalem Siliziumoxid bei einem pH-Wert von 9,8 die eine kombinierte chemische Reaktion mit schonender Politur darstellt, die im Ergebnis eine kratzerfreie Darstellung im REM ermöglicht (Abb. 7 a+b).

Die am REM (FEI Quanta 600 FEG ESEM, Hillsboro, USA), angebrachte Energiedispersive Mikroanalysesonde (EDX-Sonde) ist für besonders leichte Elemente wie z.B. Fluor weniger geeignet. Leichtere Elemente können genauer mit einer Wellenlängendispersiven Mikroanalysesonde (WDX-Sonde) bestimmt werden, die im zur Verfügung stehenden gerät des Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR) erst nachgerüstet werden soll. Beide Verfahren arbeiten qualitativ bis semiquantitativ, für die quantitative Darstellung des Fluoridgehaltes wurde eine Mikrosonde verwendet. Die für das REM präparierten Blöckchen konnten für diese Analyse verwendet werden

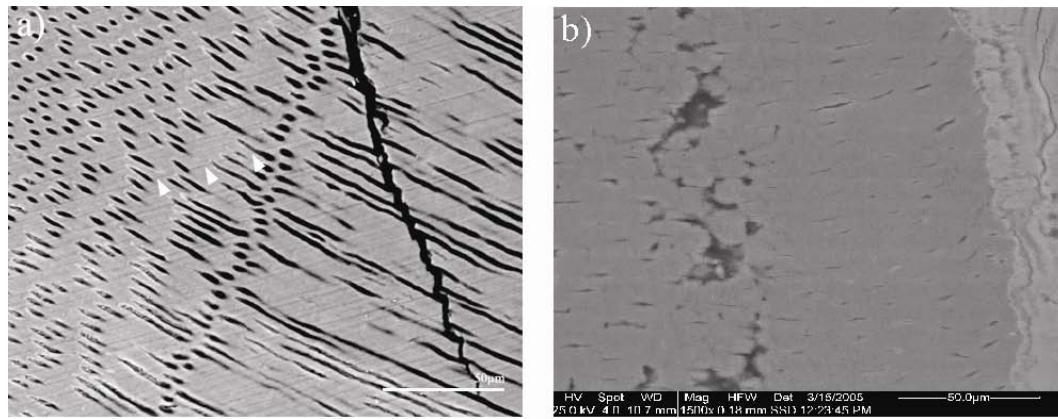


Abb. 8: Dentin im REM (BSE Modus), Vergleich verschiedener Poliermethoden. **a)** mit herkömmlichen Siliziumkarbidpapieren bleiben deutliche Schleifspuren (\triangleright). **b)** mit Diamantsuspension und OP-S Kolloidal Silica Suspension ist die polierte Fläche frei von Schleifspuren.

7.4. Mikrosonde

Zur Erstellung von Kalzium- und Fluoridprofilen entlang einer Achse von der Schmelzoberfläche zur Pulpaoberfläche wurden Messungen mit einer Mikrosonde (Elektron Microprobe CAMECA SX 100, Paris, Frankreich) erstellt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der sehr hohen Auflösung, die Nachweisgrenze für Fluorid liegt unter 300ppm. Nachteilig an dieser Methode ist die lange Messdauer. Das Gerät hat 4 Halter für Proben, ein Halter wird immer mit einem Standard (Fluorapatit) besetzt. Die punktuelle Einzelmessung dauert ca. 1:45 min. Dazu wird mit einem hochenergetischen Elektronenstrahl ein Feld von 10 µm bestrahlt. Physikalische Wechselwirkungen können mit unterschiedlichen Detektoren aufgefangen und in Information umgewandelt werden (http://www.bgr.bund.de/cln_092/nn_335066/DE/Themen/GG__Mineral/Mikroanalytik/Mikrosonde/mikrosonde__inhalt.html?__nnn=true). Je nach Probengröße (gesamte Messstrecke) und Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten variiert die Messdauer einer Probe. Für die vorliegende Untersuchung wurde mit einer Distanz von 120 µm zwischen den einzelnen Punkten gemessen. Je nach Probengröße dauert die Messung einer Probe zwischen 30 min und 90 min. Somit ist diese Methode sehr zeitintensiv. Um den Ablauf im Bundesamt für Geographie und Rohstoffkunde (Hannover), die freundlicherweise die Messungen durchgeführt haben, minimal zu beeinflussen, wurden die Distanzen zwischen den Messpunkten auf 120µm festgelegt und die Anzahl der Proben beschränkt. Geringere Distanzen hätten zwar die Auflösung erhöht, aber die Aussagekraft der Ergebnisse wäre nicht in dem Maße gestiegen, die einen weiter erhöhten Zeitaufwand gerechtfertigt hätten.

7.5. Fazit

Die Wahl der angewandten Methoden unterliegt verschiedenen Kriterien: Im Vordergrund steht das beste mögliche Ergebnis in kosten- und zeiteffizienter Weise. Die beschriebenen Präparationstechniken und damit verbundenen Analysetechniken haben sich etabliert. Nachteile dieser Methoden sind der Verlust von Material; die Präparation ist maximal invasiv und nach erfolgter Präparation ist die Probe für weitere Untersuchungen nicht mehr verfügbar. Eine vergleichbar Hochauflösende Methode, die die Probe nicht zerstört, ist die neueste Generationen von µCT oder x-ray synchrotron microtomography. Diese Methode kommt in einen Auflösungsbereich von unter 1 µm hinein, welche die Darstellung der

Dentinmikrostrukturen zulässt. Momentan ist die Probengröße noch stark limitiert und bereits größere Zähne können nicht mehr im Ganzen untersucht werden. Für die vorliegende Untersuchung ist die Unversehrtheit der Probe nicht höher zu bewerten, als die möglichen Ergebnisse (wie dies z.B. bei fossilen Proben der Fall ist). Die vorliegenden Proben stammen aus dem Jagdbetrieb und sind somit in großer Zahl verfügbar.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie zur vergleichenden Analyse Fluorid-induzierter Veränderungen des Dentins permanenter Backenzähne von Paarhufern (Artiodactyla; Cervidae und Suidae) kann wie folgt zusammengefasst werden:

1: Das Spektrum fluorid-induzierter Veränderungen der Struktur und Mineralisation des Dentins ist erfasst und eingeordnet worden. Das Spektrum umfasst Akzentuierte Langeriodische Inkrementelle Linien (ALPI, oder auch Andresen Linien), welche leichtere Mineralisationsstörungen in Form von Hypomineralisierungen repräsentieren. Als Folge schwererer Störungen der Mineralisation wurde das Auftreten von Interglobulardentin festgestellt. Das Hartgewebe ist in diesen Bereichen unvollständig ausgebildet, die organische Matrix ist davon nicht betroffen. Beide Störungen sind systemisch miteinander verbunden und können nebeneinander auftreten. Beide Veränderungen sind unterschiedliche Ausprägungsformen einer Störung der Dentinmikrostruktur. Der Bezug zu erhöhter Fluoridaufnahme konnte nachgewiesen werden (erhöhter Knochenfluoridgehalt und hoher DLI).

2: Es wurde erstmals ein Bewertungsschema für die Beurteilung der Störungen der Entwicklung im Dentin der Rehe und Rothirsche entwickelt. Dieses Schema ermöglicht den intraindividuellen Vergleich des Dentins, welches zu verschiedenen Zeiten gebildet wurde (verschiedene Zähne eines Individuums). Der interindividuelle Vergleich gleicher Zähne ermöglicht den Vergleich der Störungen im zeitgleich gebildeten Dentin.

3: Die Kombination aus Verteilung der Mineralisationsstörungen in einem Individuum (Punkt 2) und der Messung von Fluoridprofilen entlang bucco-lingualer bzw. mesio-distaler Profile hat ergeben, dass die Bildung des Dentins während der intrauterinen Phase und der Laktationsphase gegen den Einfluss von Fluorid abgeschirmt ist. Diese Hypothese, welche aufgrund der Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung des Schmelzes postuliert wurde, kann somit auch durch die vorliegenden Untersuchungen des Dentins fluorotischer Paarhufer bestätigt werden. Als wirksame Mechanismen, die die Bildung des Dentins in der intrauterinen Phase und der Laktationsphase vor dem Fluorideinfluss schützen sind die Plazentabarriere im Uterus und die Blut-Milch-Schranke in den Milchdrüsen

4: Die Untersuchung des Dentins ermöglicht eine erweiterte Betrachtung der Chronologie einer individuellen Fluoridbelastung über den Zeitraum der Amelogenese hinaus. Schwankungen der Belastung können anhand der Fluoridprofile beobachtet werden. Individuen, welche erst nach Abschluss der Amelogenese mit Fluorid belastet wurden, kann durch die Kombination der Fluoridmessung im Profil und der Analyse der Mineralisationsstörungen im Dentin die individuelle Belastung nachgewiesen werden. Die rein makroskopische Betrachtung der Gebisse solcher Tiere würde eine Fluoridbelastung im Anschluss an den Zeitraum der Amelogenese nicht, oder nur mit weiteren Verfahren (Knochenfluoridbestimmung) erfassen. Die Knochenfluoridbestimmung erfasst nicht die Chronologie einer individuellen Fluoridbelastung, da der Knochen ständigen Umbauprozessen unterliegt.

Die Analyse des Dentins von Paarhufern aus Gebieten mit erhöhter Fluoridbelastung erweitert somit die Möglichkeiten der Erfassung von lokalen Immissionen.

9. Literaturverzeichnis

Adloff P (1914) Zur Entwicklungsgeschichte des Cervidengebisses, ein Beitrag zur Frage der prälaktealen Dentition. Anat Anz 46: 359-366

Andresen V (1898) Die Querstreifung des Dentins. Deutsche Monatsschrift für Zahnheilkunde: Organ des Zentralvereins deutscher Zahnärzte S. 386-389

Aoba T, Fejerskov O (2002) Dental fluorosis: chemistry and biology. Crit Rev Oral Biol Med 13 (2): 155-170

Appleton J (1988) The ultrastructure of dentine from rat incisors following exposure to sodium fluoride and potassium pyroantimonate staining. Scanning Microsc 2 2045–2054

Appleton J (1991) The Effect of Lead Acetate on Dentine Formation in the Rat. Archs oral Biol 36(5): 377-382

Appleton J (1992) Dentinogenesis and the Calciotraumatic Response to the Injection of Lead and Fluoride Ions. Scanning Microscopy 6(4): 1073-1081

Appleton J (1993) Structure of Dentine after the Injection of Strontium Chloride by Backscattered Electron Imaging in the Scanning Electron Microscope. Archs oral Biol 38(1) 1-4

Appleton J (1994) Formation and Structure of Dentine in the Rat Incisor after chronic Exposure to Sodium Fluoride. Scanning Microscopy 8(3) 711-719

Appleton J (1995) Changes in the Plasma Electrolytes and Metabolites of the Rat following acute Exposure to Sodium Fluoride and Strontium Chloride. *Archs oral Biol* 40: 265-268

Appleton J, Chesters J, Kierdorf U, Kierdorf H (2000) Changes in the Structure of Dentine from Cheek Teeth of Deer Chronically Exposed to High Levels of Environmental Fluoride. *Cells Tissues Organs* 167: 266-272

Arnold W H (2006) Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amelogenese. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 61: 524-534

Avery J K (1994) *Oral Development and Histology*. Second Edition. Thieme Medical Publishers, Inc. New York

Benecke N (1984) *Der Mensch und seine Haustiere*. Konrad Theiss Verlag GmbH & Co. Stuttgart

Berkovitz B K B, Holland G R, Moxham B J (1980) *Farbatlas und Lehrbuch der oralen Anatomie*. Hanser Verlag, München

Bradford E W (1967) Microanatomy and histochemistry of dentine. In: Miles, A.E.W. (Ed.), *Structural and Chemical Organization of Teeth*, vol. II. Academic Press, New York, pp. 3–34.

Briedermann L (1990) *Schwarzwild*. 2nd edn. DLV, Berlin

Brown W A B, Chapman N G (1991a) The dentition of red deer (*Cervus elaphus*): a scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J Zool* 224: 519-536

Brown W A B, Chapman N G (1991b) Age assessment of red deer (*Cervus elaphus*): from a scoring scheme based on radiographs of developing permanent molariform teeth. *J Zool* 225: 85-97

Bull G, Payne S (1982) Tooth eruption and epiphysal fusion in pigs and wild boar: In Wilson B, Payne S (eds.) *Aging and sexing animal bones from archeological sites* British Archeological Reports British Series 109, Oxford

Davies A S (1990) Postnatal development of the lower canine and cheek teeth of the pig. *Anat Histol Embryol* 19: 269-275

Danilkin A A (1995) *Capreolus pygargus*. The American Society of Mammalogists. *Mammalian Species*. No. 512, pp. 1-7

Dean M C (1993) Daily Rates of Dentine Formation in Macaque Tooth Roots. *Int J Osteoarcheol* 3: 199-206

Dean M C, Beyon A D, Reid D J, Whittaker D K (1993) A Longitudinal Study of Tooth Growth in a Single Individual Based on Long- and Short-period Incremental Markings in Dentine and Enamel. *Int J Osteoarcheol* 3: 249-246

Dean M C, Scandrett A E (1995) Rates of dentine mineralization in permanent human teeth. *Int J Osteoarcheol* 5: 349-358

Dean M C, Scandrett A E (1996) The Relation between long-period incremental markings in dentine and daily cross-striations in enamel in human teeth. *Archs oral Biol* 41: 233-244

Dean M C (1998) Comparative observations on the spacing of short-period (von Ebner's) lines in dentine. *Archs oral Biol* 43: 1009-1021

Dean M C (2006) Tooth microstructure tracks the pace of human life-history evolution. *Proc. R. Soc. B* 273: 2799–2808.

Eanes E D, Hailer A W (1998) The Effect of Fluoride on the Size and Morphology of Apatite Crystals Grown from Physiologic Solutions. *Calcif Tissue Int* 63: 250-257

von Ebner V (1902) Histologie der Zähne mit Einschluss der Histogenese. In: *Handbuch der Zahnheilkunde*. Scheff J (Ed.) Holder, Wein 243-299

Eisenmann D R, Yaeger J A (1969) Alterations in the formation of rat dentine and enamel induced by variuos ions. *Arch Oral Biol* 14: 1045-1064

Ekstrand J, Alván G, Boréus L O, Norlin A (1977) Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. *Eur J Clin Pharmacol* 12 (4): 311-317

Ekstrand J, Boreus L O, Dechateau P (1981) No Evidence of transfer of fluoride from plasma to breast-milk. *British Medical Journal* 283: 761-762

Enders A C (1965) A comparative Study of the Fine Structure of the Trophoblast in Several Hemochorial Placentas. *AM J Anat* 116: 29-68

Fejerskov O, Yaeger J A, Thylstrup A (1979) Microradiography of the effect of acute and chronic administration of fluoride on human and rat dentine and enamel. *Archs Oral Biol* 24: 123-130

Fejerskov O, Manji F, Baelum V, Møller I J (1988) Dental fluorosis – a handbook for health workers. Munksgaard, Copenhagen

Fejerskov O, Larsen M J, Richards A, Baelum V (1994) Dental Tissue Effects of Fluoride. *Adv Dent Res* 8 (1): 15-31

Fejerskov O, Ekstrand J, Burt B A (1996) Fluoride in dentistry. 2nd ed. Munksgaard, Copenhagen

Fitzgerald CM (2000) Reading between the lines: Dental development and subadult age assesment using the microstructural growth markers of teeth. In Katzenberg MA & Saunders SR (eds) *Biological anthropology of the human skeleton*. Wiley-Liss, Hoboken: 163-186

Frank R M, Nalbandian J (1989) Structure and ultrastructure of dentine. In: Oksche, A., Vollrath, L. (Eds.), *Handbook of Microscopic Anatomy*, vol. V/6. Springer, Berlin, pp. 173–247.

Gethöffer F, Sodeikat G, Pohlmeyer K (2007) Reproductive parameters of wild boar (*Sus scrofa*) in three different parts of Germany. *Eur J Wildl Res* 53: 287-297

Glickman G N, Mickel A K, Levin L G, Fouad A F, Johnson W T (2002) Glossary of Endodontic Terms. 7th Edition. The American Association of Endodontists

Habermehl KH (1975) Altersbestimmung bei Haus- und Wildtieren. 2nd Edition, Parey, Hamburg

Hillson S W (1986) Teeth. Second Edition. Cambridge Manuals in Archeology

Hillson S W (1996) Dental Anthropology. Cambridge University Press

Hillson S W (2005) Teeth. Second Edition. Cambridge Manuals in Archeology

Iinuma Y M, Suzuki M, Yokoyama M, Tanaka-Nakamura Y, Ohtaishi N (2002) Daily Incremental Lines in Sika Deer (*Cervus nippon*) Dentine. J Vet. Med. Sci 64(9): 791-795

Iinuma Y M, Tanaka S, Kawasaki K, Kuwajima T, Nomura H, Suzuki M, Ohtaishi N (2004) Dental Incremental Lines in Sika Deer (*Cervus Nippon*); Polarized Light and Fluorescence Microscopy of Ground Sections. J Vet. Med. Sci 66(6): 665-669

Jones S J, Boyde A (1984) Ultrastructure of dentine and dentinogenesis. In: Dentine and Dentinogenesis, Vol. 1 Linde A (Ed) CRC Press, Boca Raton, Fl. Pp. 81-134

Karstad L (1967) Fluorosis in deer (*Odocoileus virginianus*). Bull Wildlife Disease Ass 3 42-46

Kawasaki K (1975) On the configuration of incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labelling. *J Anat* 119(1): 61-66

Kierdorf H (1988) Licht- und rasterelektronische Untersuchungen zur Odontogenese bei Cervidae Gray, 1821. Inaugural-Dissertation Universität Köln

Kierdorf H, Kierdorf U (1989) Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte des Gebisses beim Europäischen Reh (*Capreolus c. capreolus* L., 1758). *Zool Jb Anat* 119: 37-75

Kierdorf H, Kierdorf U, Sedlacek F, Erdelen M (1996a) Mandibular Bone Fluoride Levels and Occurrence of Fluoride Induced Dental Lesions in Populations of Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) from Central Europe *Environ Pollut* 93: 1 75-81

Kierdorf H, Kierdorf U, Sedlacek F (1996b) Biomonitoring der Fluoridbelastung des Lebensraumes von Wildwiederkäuern aus Immissionsgebieten Nordböhmens (Tschechische Republik) *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 42: 41-52

Kierdorf H, Kierdorf U (1997) Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. *Cell and Tissue Research* 289: 125-135

Kierdorf H, Kierdorf U, Boyde A (1997) A quantitative backscattered electron imaging study of hypomineralization and hypoplasia in fluorosed dental enamel of deer. *Annals of Anatomy* 179: 405-412

Kierdorf H, Kierdorf U, Sedlacek F (1999) Monitoring regional fluoride pollution in the Saxonian ore mountains (Germany) using the biomarker dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Sci Total Environ* 232: 159-168

Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A, Sedlacek F (2000) Disturbed enamel formation in Wild Boars (*Sus scrofa* L.) from fluoride polluted areas in Central Europe. *Anat Rec* 259: 12-24

Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A, Josephsen K (2004) Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig. *Anat Embryol* 207: 463-474

Kierdorf H, Kierdorf U, Witzel C (2005) Deposition of cellular cementum onto hypoplastic enamel of fluorotic teeth in wild boars (*Sus scrofa* L.). *Anat Embryol* 209: 281-286

Kierdorf U (1988) Untersuchungen zum Nachweis immissionsbedingter chronischer Fluoridintoxikation beim Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Z. Jagdwiss* 34: 192-204

Kierdorf U, Kierdorf H (1989) A scanning electron microscopic study on surface lesions in fluorosed enamel of roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Vet Pathol* 26: 209-215

Kierdorf U, Kierdorf H, Krefting E R (1991) Elektronenstrahl-Mikrosonden-Untersuchung des Fluorgehaltes und der Fluorverteilung in Schmelz und Dentin fluorotischer und nicht fluorotischer Backenzähne des Rehes (*Capreolus capreolus* L.). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 37: 232-239

Kierdorf U, Kierdorf H, Fejerskov O (1993) Fluoride-induced developmental changes in enamel and dentine of European Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.) as a result of environmental pollution. *Arch oral Biol* 38 (12): 1071-1081

Kierdorf U, Schultz M, Kierdorf H (1994) Licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Schmelzhypoplasien fluorotischer Rehzähne. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 40: 175-184

Kierdorf U, Kierdorf H, Sedlacek F, Fejerskov O (1996) Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus* L.) from a region with severe environmental pollution by fluorides. *J Anat* 188: 183-195

Kierdorf U, Kierdorf H (1999) Dental fluorosis: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environ Monit Assess* 57: 265-275

Kierdorf U, Kierdorf H (2000) Comparative analysis of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*): interdental variation and species differences. *Journal of Zoology* 250: 87-93

Kierdorf U, Kierdorf H (2002) Assessing regional variation of environmental fluoride concentrations in Western Germany by analysis of antler fluoride content in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 42: 99-104.

Kurt F (1970) *Das Rehwild*. BLV. München

Kuttler, Y (1959) Classification of Dentine into primary, secondary and tertiary. *Oral Surgery* 12: 996-1001

Mahoney E K, Ismail F S M, Kilpatrick N, Swain M (2004) Mechanical properties across hypomineralized/hypoplastic enamel of first permanent molar teeth. *Eur J Oral Sci* 112: 497-502

McCane R A, Ford E H R (1961) Severe undernutrition in growing and adult animals 7. Development of the skulls, jaws and teeth in pigs. *Brit J Nutr* 15: 213-224

Mellanby M (1927) Diet and teeth: an experimental study. Part I. Dental structure in dogs; Medical Research Council, Special Report Series, No 140, London: His Majesty's Stationery Office.

Milan A M, Waddington R J, Embery G (1999) Altered Phosphorylation of Rat Dentine Phosphoproteins by Fluoride In Vivo. *Calcif Tissue Int* 64: 234-238

Milan A M, Waddington R J, Embery G (2001) Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization. *Archs oral Biol* 46: 343-351

Milan A M, Sugars R V, Embery G, Waddington (2004) Dentinal Proteoglycans demonstrate an Increasing Order of Affinity for Hydroxyapatite Crystals During the Transition of Predentine to Dentine. *Calcified Tissue Int* 75 (3): 197-204

Miles A E W (1967) Structural and Chemical Organization of Teeth. Academic Press Inc New York and London

Milhaud G E, Charles E, Loubière M-L, Kolf-Clauw M, Joubert C (1992) Effects of fluoride on secretory and postsecretory phases of enamel formation in sheep molars. *Am J Vet Res* 53 (7): 1241-1247

Monsour P A, Harbrow H, Warshawsky H (1989) Effects of acute doses of sodium fluoride on the morphology and the detectable calcium associated with secretory ameloblasts in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 27: 463-471

Mortimer C E (1996) *Chemie - Das Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Moseley R, Sloan A J, Waddington R J, Smith A J, Hall R C, Embery G (2003) The influence on the cellular morphology and synthetic activity of the rat dentine-pulp complex in vitro. *Archs Oral Biol* 48: 39-46

Moudgil K D (1982) No Evidence of transfer of fluoride from plasma to breast-milk. *British Medical Journal* 284: 200-201

Nanci A (2003) *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Mosby Inc., An Affiliate of Elsevier, St. Louis, Missouri

Nanci A (2008) *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Mosby Inc., An Affiliate of Elsevier, St. Louis, Missouri

Nelson D G A, Coote G E, Vickridge I C, Suckling G (1989) Proton microprobe determination of fluorine profiles in the enamel and dentine of erupting incisors from sheep given low and high daily doses of fluoride. *Archs Oral Biol* 34: 419-429

Niethammer J, Krapp F (1986) Handbuch der Säugetiere Europas, Band 2/II Paarhufer – Artiodactyla (Suidae, Cervidae, Bovidae). AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden

Owen R (1845) Odontography or a treatise on the comparative anatomy of the teeth: their physiological relations, mode of development and microscopic structure in the vertebrate animals. London: Hyppolyte Baillière

Owens P D A (1968) The effects of undernutrition and rehabilitation on the jaws and teeth of pigs. In: "Calorie deficiencies and protein deficiencies Proceedings Glaxo Conference, London, Churchill 341-347

Piesco N P (1994) Histology of dentin. In: Avery J K (Ed.) Oral Development and Histology. second edition Thieme, New York, pp. 242–260

Raesfeld F Freiherr von, Neuhaus AH, Schaich K (2003a) Das Rehwild. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart

Raesfeld F Freiherr von, Reulecke K (2003b) Das Rotwild. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart

Richards A, Kragstrup J, Josephsen K Fejerskov O (1986) Dental fluorosis developed in post secretory enamel. J Dent Res 65: 1406-1409

Richards A, Coote G E, Pearce E I F (1994) Proton Probe and Acid-Etching for Determining Fluoride Profiles in Porous Porcine Enamel J Dent Res 73 (3): 644-651

Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes S J, Shore R C (2004) The Effect of Fluoride on the Developing Tooth. *Caries Res* 38: 268-276

Rojas-Sanchez F, Alaminos M, Campos A, Rivera H, Sanchez-Quevedo M C (2007) Dentin in Severe Fluorosis: A Quantitative Histochemical Study. *J Dent Res* 86 (9): 857-861

Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. neu überarbeitete Auflage herausgegeben von P. Böck. Urban und Schwarzenberg, München

Schmidt W J, Keil A (1958) *Die gesunden und die erkrankten Zahngewebe des Menschen und der Wirbeltiere im Polarisationsmikroskop*. Carl Hanser Verlag, München

Schroeder H E (2000) *Orale Strukturbilogie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. 5., unveränderte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Schultz M (1988) Methoden der Licht- und Elektronenmikroskopie. In Knußmann R (Hrsg.): *Anthropologie - Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen*, Band I/1. Fischer, Stuttgart 698-730

Schultz M, Kierdorf U, Frantisek S, Kierdorf H (1998) Pathological bone changes in the mandibles of wild red deer (*Cervus elaphus* L.) exposed to high environmental levels of fluoride. *J Anat* 193 (3): 431-442

Schultz M (2001) Paleohistopathology of bone: A new approach to the study of ancient diseases. Yearbook of Physical Anthropology 44: 106-147

Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett J D (2008) Fluoride Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibits Protein Synthesis and Secretion. Environ Health Perspect 116: 1142-1146

Shearer T R, Kolstad B S, Suttie J W (1978) Bovine Dental Fluorosis: Histologic and Physical Characteristics. Am J Vet Res 39: 597-602

Shupe J L, Olsen A E (1983) Clinical and pathological aspects of fluoride toxicosis in animals. In Fluorides: Effects on Vegetation, Animals and Humans, ed. J. L. Shupe, H. B. Peterson & N. C. Leone. Paragon Press, Inc., Salt Lake City 319-338

Shupe J L, Bagley C V (1992) Placental Transfer of Fluoride in Holstein Cows. Vet Hum Toxicol 34: 395-399

Smith A J, Cassidy N, Perry H, Be'gue-Kirn C, Ruch J V, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol 38: 273-280

Spreter v. Kreudenstein T (1939) Experimentelle Beiträge zur Pathologie der Zahnhartgewebsentwicklung. Sammlung Meusser, Heft 36; Hermann Meusser Verlag Leipzig

Stubbe C (1997) Rehwild. Biologie, Ökologie, Bewirtschaftung. Parey, Berlin

Suckling G, Thurley D C, Nelson D G A, (1988) The Macroscopic and Scanning Electron-Microscopic Appearance and Microhardness of the Enamel, and the related Histological Changes in the Enamel Organ of erupting Sheep Incisors resulting from a prolonged low daily Dose of Fluoride. *Archs oral Biol* 33(5): 361-373

Suttie J W, Faltin M S (1971) Effect of a Short Period of Fluoride on Dental Fluorosis in Cattle. *Am J Vet Res* 32 (2): 217-222

Suttie J W, Faltin M S (1973) Effects of Sodium Flouride in Dairy Cattle: Influence of Nutritional State. *Am J Vet Res* 34 (4): 479-483

Suttie J W, Hamilton R J, Clay A C, Tobin M L, Moore W G (1985) Effects of fluoride ingestion on white-tailed deer (*Odocoileus Virginianus*). *J of Wildlife Diseases* 21 (3): 283-288

Suttie J W, Dickie R, Clay A B, Nielsen P, Mahan W E, Baumann D P, Hamilton R J (1987) Effects of fluoride emissions from a modern primary aluminium smelter on a local population of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) *J Wildlife Dis* 23 (1): 135-143

Suzuki Y, Yamaguchi A, Ikeda T, Kawase T, Saito S, Mikuni-Takagakil Y (1998) In situ Phosphorylation of Bone and Dentin Proteins by the Casein Kinase IT-like Enzyme. *J Dent Res* 77 (10): 1799-1806

Ten Cate A R (1985) *Oral Histology: Development, Structure and Function*. The C. V. Mosby Company St. Louis, Missouri

Tonge C H, McCane R A (1973) Normal development of the jaws and teeth in pigs, and the delay and malocclusion produced by calorie deficiencies. *J Anat* 115(1): 1-22

Van den Bos T, Beertsen W (1994) Bound phosphoproteins enhance mineralisation of alkaline phosphatase-collagen complexes in vivo. *J Bone Miner Res* 9: 1205-1209

Valach R (1990) Search for key ecotoxic factors in the North Bohemian coal basin. Internal report Ceske Budejovice: Ustav Krajine Ekologika AV CR

Veron M H, Couble M L, Magloire H (1993) Selective Inhibition of Collagen Synthesis by Fluoride in Human Pulp Fibroblasts In Vitro. *Calcif Tissue Int* 53: 38-44

Vieira A P G F, Hancock R, Limeback H, Schwartz M, Gryn timer M D (2003) How does fluoride concentration in the tooth affect apatite crystal size? *J Dent Res* 82 (11): 909-913

Vieira A P G F, Hancock R, Eggertsson H, Everett E T, Gryn timer M D (2005) Tooth Quality in Dental Fluorosis: Genetic and Environmental Factors. *Calcif Tissue Int* 76: 17-25

Vikøren T, Stuve G (1996) Fluoride exposure in cervids inhabiting areas adjacent to aluminium smelters in Norway. II. Fluorosis *J Wildl Dis* 32: 181-189

Waddington R J, Langley M S (1998) Structural Analysis of Proteoglycans Synthesized By Mineralizing Bone Cells In Vitro in the Presence of Fluoride. *Matrix Biol* 17 (4): 255-268

Waddington R J, Moseley R, Smith A J, Sloan A J, Embury G (2004) Fluoride-induced changes to proteoglycan structure synthesised within the dentine-pulp complex in vitro. *Biochemica et Biophysica Acta* 1689: 142-151

Wagenknecht E (1996) *Der Rothirsch: Cervus elaphus*. Westarp Wissenschaften

Warshawski H (1988) The Teeth. In Weiss L (ed) *Cell and Tissue Biology* 6th Edition. Urban and Schwarzenberg, Baltimore 595-640

Weatherell J A, Deutsch D, Robinson C, Hallsworth A S (1977) Assimilation of Fluoride by Enamel throughout the Life of the tooth. *Caries Res* 11: 85-115

WHO (World Health Organization) (2002) *Fluorides. Environmental Health Criteria*, Vol. 227. Geneva; 268 pp.

Whitford G M (1996) *The Metabolism and Toxicity of Fluoride*. 2nd revised edition. In: *Monographs in Oral Science* Vol. 16, Myers H M (ed.) Karger

Whyte M P, Totty W G, Lim V T, Whitford G M (2008) Case Report Skeletal Fluorosis From Instant Tea. *J Bone Miner Res* 23: 759-769

Wurtz T, Houaria S, Mauroa N, MacDougall M, Peters H, Berdala A (2008) Fluoride at non-toxic dose affects odontoblast gene expression in vitro. *Toxicology* 249: 26–34

Yaeger J A (1966) The effects of higher fluoride Diets on Developing Enamel and Dentin in the Incisors of Rats. Am J Anat 118: 665-684

Yilmaz S, Newman H N, Poole D F G (1977) Diurnal periodicity of von Ebner growth lines in pig dentine. Archives of Oral Biology 22: 511-513

Zemek F, Herman M, Kierdorf H, Kierdorf U and Sedlacek F (2006) Spatial distribution of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from North Bohemia (Czech Republic) and its relationships with environmental factors. Sci Total Environ 370: 491-505

Internetquellen

Bundesamt für Geographie und Rohstoffkunde (BGR), Mikrosonde, Stand: 10.08.2009

http://www.bgr.bund.de/cln_092/nn_335066/DE/Themen/GG_Mineral/Mikroanalytik/Mikrosonde/mikrosonde_inhalt.html?nnn=true

Rowiak GmbH Hannover, Stand 7.12.2010

www.rowiak.com

10. Vollständige Liste der Publikationen mit eigener Beteiligung

Publikationen:

Richter, H.; Kierdorf, U.; Richards, A.; Melcher, F.; Kierdorf, H.; (2011) Fluoride concentration in dentin as a biomarker of fluoride intake in European roe deer (*Capreolus capreolus*) – an electron-microprobe study. AOB in press

Richter, H., Kierdorf, H.;Kierdorf, U., Clemen, G., Greven, G. (2010) A microscopic and microanalytical study (Fe, Ca) of the teeth of the larval and juvenile *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Urodela: Ambystomatidae). *Vertebrate Zoology* 60 (1): 27-35

Richter, H., Kierdorf, U., Richards, A., Kierdorf, H. (2010) Dentin abnormalities in cheek teeth of wild red deer and roe deer from a fluoride-polluted area in Central Europe; *Ann Anat* 192 (2): 86-95

Kreutz K, **Richter H (2008)** Anthropologische Untersuchung der Skelettfunde von St. Michaelis in Hildesheim: Grabungskampagne 2006 - unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen Lesefunde. In: Segers-Glocke C. (Hrsg.) St. Michaelis in Hildesheim - Forschungsergebnisse zur bauarchäologischen Untersuchung im Jahr 2006. Arbeitshefte zur Denkmalpflege in Niedersachsen 34. S. 170-187

Kongressbeiträge:

Richter H., Kierdorf U, Melcher F, Kierdorf H (2008) A light microscopic, microradiographic and electron-probe study on developmental defects in fluorotic dentin of deer; 14th International Symposium on Dental Morphology, Greifswald, Germany (Poster)

Richter H, Melcher F, Kierdorf H (2007) Electron-probe studies on fluoride concentration in teeth of fluorosed wild artiodactyls; 2nd International Symposium “Game and Ecology”, Plitvice Lakes National Park, Republic of Croatia

Richter H, Richards A, Kierdorf H (2006) Histopathology of fluorotic coronal dentine of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) teeth; 6th International Deer Biology Congress, Prague

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Horst Kierdorf für die Themenstellung, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Überlassung des Materials und die Betreuung der Arbeit. Prof. Dr. Horst Kierdorf war stets bereit zu fachlicher Diskussion und Unterstützung. In seiner Funktion als Institutsleiter hat er es geschafft eine Arbeitsatmosphäre entstehen zu lassen, die einmalig ist.

Prof. Dr. Uwe Kierdorf möchte ich für die fachliche Unterstützung danken. Besonders bei der Auswertung statistischer Daten war er eine große Hilfe. Prof. Dr. Uwe Kierdorf hat die Rolle eines zweiten Betreuers übernommen!

Prof. Dr. Alan Richards, Kaj Josephsen, Anne Benner, Lene Grønkjaer und allen anderen Mitarbeitern des „Royal Dental College“ (Universität Aarhus, Dänemark) möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während meines Aufenthaltes vor Ort danken. Ohne sie wäre die Masse an Mikroradiographien in so kurzer Zeit nicht möglich gewesen.

Dr. Frank Melcher, Detlev Klosa und S. Lodziak vom Bundesamt für Geowissenschaften und Rohstoffe möchte ich für die Benutzung des Rasterelektronenmikroskops und die Durchführung der Mikrosondenmessungen danken.

Ich möchte allen Mitgliedern des Instituts für Biologie und Chemie danken, die mir während meiner Promotionszeit begegnet sind und teilweise das Institut schon wieder verlassen haben. Sie alle haben einen Beitrag zu dieser einmaligen Arbeitsatmosphäre beigetragen und es sind Freundschaften über die Arbeit hinaus entstanden. Besonders erwähnen möchte ich: Peter Zahn, mit dem ich diverse Büros geteilt habe und so manche Veranstaltung erfolgreich durchgeführt habe, Regina Zander und Susanne Ohlendorf, die „den Laden zusammenhalten“ und immer ein offenes Ohr hatten, Kerstin Kreutz, die mich auf Exkurse in die Anthropologie mitgenommen hat, Carsten Witzel für den fachlichen und technischen Austausch zum Thema Zähne.

Ohne den Rückhalt in jeder Hinsicht von meiner Frau Maren wäre vieles nicht möglich gewesen. Besonders die räumliche Trennung in der Anfangszeit war nicht

einfach. Ich möchte dir dafür danken, dass du das Abenteuer Promotion mit mir durchgestanden hast.

Meinen Eltern gebührt besonderer Dank, weil sie meine Laufbahn immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ebenso danke ich meinen übrigen Familienmitgliedern, die trotz der langen Zeit an mich geglaubt haben, aber immer beharrlich den Fortschritt verfolgt haben.

Danke an alle, die diese Arbeit direkt oder indirekt ermöglicht haben!

12. Anhang

This is a post-print (i.e. final draft post-refereeing) self-archived version of the original publication by Elsevier which is available at www.elsevier.com doi:10.1016/j.aanat.2009.12.003

Dentin abnormalities in cheek teeth of wild red deer and roe deer from a fluoride-polluted area in Central Europe

Heiko Richter^a, Uwe Kierdorf^a, Alan Richards^b, Horst Kierdorf^{a*}

^aDepartment of Biology, University of Hildesheim, Marienburger Platz 22, 31141 Hildesheim, Germany

^bRoyal Dental College, University of Aarhus, Vennelyst Boulevard, 8000 Aarhus C, Denmark

Short title: Dentin abnormalities in fluorotic deer teeth

*Corresponding author. Tel.: +49 (0) 5121883913; fax: +49 (0) 5121883911; e-mail: kierdorf@uni-hildesheim.de (H. Kierdorf)

Abstract

The study analyses the severity and distribution of mineralization defects in the dentin of red and roe deer teeth (mandibular fourth premolars, first and third molars) obtained from individuals that had lived in a fluoride-polluted area along the Czech-German border. Mineralization defects presented as hypomineralized or interglobular dentin. In the P₄s and M₃s the entire dentin exhibited areas of defective mineralization, whereas in the M₁s only the central and inner dentin portions were affected. This suggests that the early periods of dentin formation in the first molar, occurring during the late fetal and early postnatal (milk-feeding) periods of life, are protected against exposure to excess fluoride levels. Our findings are consistent with the hypothesis that certain protective mechanisms (partial placental diffusion barrier and blood-milk barrier to fluoride, clearance of fluoride from plasma by the rapidly growing skeleton) operate during these ontogenetic periods. Studying fluoride-induced dentin abnormalities in addition to enamel fluorosis broadens the time window during which fluoride effects on the developing dental hard tissues can be recorded. Including dentin in the analysis of dental fluorosis allows a more detailed reconstruction of lifetime fluoride exposure than would be possible by studying enamel fluorosis only, thereby adding to the significance of free-ranging deer as bioindicators of fluoride pollution.

Key words

Bioindication, environmental pollution, interglobular dentin, lesion scoring, mineralization defects, teeth

Introduction

Dentin is the mineralized tissue that forms the bulk of the teeth. It is produced by specialized cells, the odontoblasts, that differentiate from ectomesenchymal cells of the dental papilla. Contrary to osteoblasts, which become entrapped into the secreted bone matrix as osteocytes, the odontoblasts remain at the surface of the matrix, moving centripetally during dentin formation. In doing so, each odontoblast leaves behind an elongating cytoplasmic extension (odontoblastic process) that is located in a channel-like structure, the dentinal tubule. Unlike bone, dentin is not remodeled and therefore disturbances during formation leave a permanent record in the dentin (Frank and Nalbandian, 1989; Piesco, 1994; Nanci, 2008).

Dentinogenesis is basically a two-step process. First an organic matrix, consisting predominantly of collagen, is secreted by the odontoblasts. This matrix (the predentin) is then processed and mineralized with hydroxyapatite as the principal mineral. The mineralization front follows that of matrix secretion at some distance and, in consequence, a rim of unmineralized predentin overlies the mineralized dentin (Nanci, 2008).

Different types of dentin can be distinguished. Primary dentin is defined as the tissue formed either prior to completion of root formation in low-crowned teeth or prior to achievement of occlusal contact in high-crowned teeth. Secondary dentin is the dentin deposited after completion of root formation or after the tooth has come into occlusion. Secondary dentin is formed by the same odontoblasts that also produced the primary dentin, although at a slower rate (Piesco, 1994, Nanci, 2008). However, tubule density is lower in secondary compared with primary dentin, because with ongoing dentinogenesis the inner surface of the dentin is reduced, resulting in a crowding of the odontoblasts and the death of some of them. Tertiary dentin is formed at specific sites of the dentin-pulp interface in response to

environmental stimuli. Two types of tertiary dentin, reactionary and reparative, are distinguished. Reactionary dentin is formed by surviving odontoblasts following milder stimuli, while reparative dentin is produced in response to strong stimuli by newly differentiated odontoblast-like cells following the death of the original odontoblasts (Smith et al., 1995).

Dentin formation is a rhythmic process, which is reflected by the presence of incremental markings (or lines) in the tissue. Short-period incremental markings, mostly referred to as von Ebner lines, reflect a daily rhythm of dentin formation. Superimposed on this circadian rhythm is a rhythm with a longer periodicity (5 to 10 days in humans) that causes the formation of long-period markings which are mostly referred to as Andresen lines (Frank and Nalbandian, 1989; Dean and Scandrett, 1996; Dean, 2006, Nanci, 2008). Most authors regard the incremental markings as reflecting cyclic alterations in dentin mineralization (Bradford, 1967; Frank and Nalbandian, 1989; Piesco, 1994; Dean and Scandrett, 1996; Dean, 2006), whereas Nanci (2008) states that they are caused by periodic changes in collagen fiber orientation of the matrix.

Intake of excessive amounts of fluoride during dental development interferes with the formation of the dental hard tissues and leads to a pathological condition known as dental fluorosis (Shupe and Olson 1983; Suckling et al., 1988; Fejerskov et al., 1994, 1996; Kierdorf et al., 1993, 1996b, 2000, 2004; Aoba and Fejerskov, 2002). The characteristic macroscopic appearance of fluorotic teeth reflects an impairment of amelogenesis. In cervids, the structural abnormalities of fluorotic enamel have been described in red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) (Kierdorf and Kierdorf, 1989b, 1997; Kierdorf et al., 1993, 1996a,b, 1997). In both species a characteristic distribution of fluorotic defects within the permanent cheek teeth was observed that could be related to the sequence of tooth

development. (Kierdorf et al., 1993, 1996b; Kierdorf and Kierdorf, 2000). Thus in red and roe deer, the enamel of first molars from fluorotic mandibles showed either no or only minor fluorosis. In contrast, the enamel of the permanent premolars and the third molars regularly exhibited severe fluorosis. This led to the hypothesis that during certain ontogenetic periods protective mechanisms exist that prevent excessive fluoride exposure of the developing teeth. These presumed mechanisms are a partial placental diffusion barrier to fluoride, a blood-milk-barrier to fluoride, causing a low fluoride exposure of the young during the period of milk feeding, and a rapid clearance of fluoride from plasma during the phase of fast skeletal growth (Kierdorf et al., 1993; Kierdorf and Kierdorf, 2000).

The suitability of free-ranging deer as bioindicators of fluoride pollution has been repeatedly demonstrated (Karstad, 1967; Suttie et al., 1987; Kierdorf, 1988; Kierdorf et al., 1996a, 1999; Vikøren and Stuve, 1996; Kierdorf and Kierdorf, 1999; Zemek et al. 2006). In some of these studies a dental lesion index of fluorosis (DLI) was used to quantify the degree of macroscopic fluorotic changes in the dentition. The numerical value of the DLI is the sum of the lesion scores (ranging from 0 to 5) of the six permanent teeth ($P_2 - P_4$ and $M_1 - M_3$) present in a mandibular cheek tooth row of a deer (Kierdorf and Kierdorf, 1999, 2000; Kierdorf et al., 1999). As fluoride causes defects only in forming enamel, excess fluoride exposure starting after completion of amelogenesis, i.e. when the enamel crown is fully formed, cannot be detected by external inspection of teeth.

Analyzing the dentin in addition to enamel provides an opportunity to extend the period for which fluoride effects on individuals can be recorded based on the analysis of their teeth. This is because dentin, in contrast to enamel, is formed throughout the life of a tooth, although at considerably varying rates. So far, however, only one study analyzed the dentinal structure in fluorotic deer teeth

(Appleton et al., 2000). The focus of that paper was, however, on the occurrence and obliteration of giant tubules in the fluorotic dentin. In contrast, several experimental studies reported on the effects of excess fluoride on dentin structure and mineralization in rodents, domestic pigs, and cattle (Yaeger, 1963, 1966; Eisenmann and Yaeger, 1969, 1972; Suttie et al., 1971; Walton and Eisenmann, 1975; Appleton, 1992, 1994; Milan et al., 1999, 2001).

The aims of the present study were 1) to record the spectrum of fluoride-induced abnormalities in the dentin of roe deer and red deer, 2) to compare the distribution and intensity of fluoride-induced dentinal lesions among permanent cheek teeth of a single individual and between the two species, and 3) to investigate whether the distribution of dentinal lesion in the analyzed teeth is consistent with the hypothesis that certain periods of tooth formation are protected against a severe fluoride impact.

Materials and Methods

Specimens

The study was conducted on mandibular cheek teeth of male roe deer and red deer (7 individuals per species) exhibiting marked dental fluorosis. The mandibles had been collected by local hunters in a fluoride-polluted region during the early 1990s. At that time the study area (border region between the Czech Republic and Germany) was exposed to severe atmospheric fluoride pollution resulting mainly from emissions of thermal power plants located in the North-Bohemian brown coal basin (Kierdorf et al., 1996a,b; Reuter et al., 1997).

Two mandibles each of male roe and red deer collected in the early 1990s in areas of western Germany not exposed to elevated fluoride deposition served as controls. The control red deer originated from the western part of the Harz mountains

(federal state of Lower Saxony), while the roe deer had been culled in a low mountain range (Bergisches Land) in the federal state of North Rhine-Westphalia). Low fluoride exposure of the respective populations has previously been demonstrated by analysis of bone fluoride concentrations (Kierdorf et al. 1996a; Kierdorf and Kierdorf 2002). The mandibles, which had been routinely cleaned (boiling in water) by the hunters, possessed a complete set of permanent cheek teeth. The age of the deer was estimated based on dental wear (Habermehl, 1985). In fluorotic individuals only the wear stage of the first molar was used for age assessment, because the other cheek teeth regularly exhibited abnormal wear. Estimated ages ranged between 4 and 9 years in red deer and between 1 and 5 years in roe deer.

Bone fluoride measurements

For chemical analysis, a sample of bone powder was collected by drilling into the body of the cleaned and dried mandible below the M_1 . Precisely weighed samples of the obtained bone powder were dissolved in 0.1 M perchloric acid. The solution was then buffered with TISAB II (Orion Research Cambridge MA, USA) and analyzed for fluoride using a fluoride ion-specific electrode (model 96-09, Orion Research). Fluoride concentrations are expressed as milligrams per kilogram (= ppm) of dried bone. Individual values given and used for calculations represent arithmetic means of two parallel determinations per bone sample.

Preparation and examination of teeth

To cover the formative period of the postcanine permanent dentition, three teeth (P_4 , M_1 and M_3) were studied from each mandible. The teeth were usually taken from the left side; however, in four cases, teeth from the right side were used because

those on the left side exhibited pathological conditions other than fluorosis. The teeth were photographed (Canon EOS D 400) and then embedded in epoxy resin (Epofix, Struers, Copenhagen, Denmark). Subsequently they were longitudinally sectioned in a bucco-lingual or mesio-distal plane, using a rotary saw with a water-cooled diamond blade (Woco 50, Conrad Apparatebau, Clausthal-Zellerfeld, Germany).

For backscattered electron (BSE) imaging in the scanning electron microscope (SEM), one of the resulting tooth blocks was polished on a motorized rotor polisher (Labopol-5, Struers) using diamond suspensions (Diapro, Struers) with respectively 9 μ m and 3 μ m particle diameters and a final polishing step (OP-S Colloidal Silica Suspension, Struers). BSE imaging of the polished surfaces was performed with a FEI Quanta 600 FEG SEM operated in a low-vacuum mode at an accelerating voltage of 20 kV.

For light microscopy, the cut surface of the other tooth half was polished using a series of silicon carbide papers (grades 600, 1200, 2400, and 4000) and mounted on a glass slide. The block was then removed from the slide using the rotary saw, leaving behind an approximately 300 μ m thick section. This was ground and polished to a final thickness of approximately 70 μ m and cover-slipped.

For microradiography, slides of 400 μ m were cut from the remaining block with a saw microtome (Leitz 1600, Wetzlar, Germany). The slides were ground and polished from both sides, again using the series of silicon carbide papers, until a final thickness of about 70 μ m was achieved. Microradiographs were produced with a Baltographe (Balteau, Liege, Belgium) on glass films (exposure time: 90 minutes; distance: 8.6 cm at 20 kV and 20 mA).

Microradiographs and ground sections were viewed and photographed in transmitted light, using an Axioskop 2 Plus microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Canon PowerShot G2 digital camera (Canon, Tokyo, Japan). The

acquired images were further processed with the software package Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA, USA).

Assessment of abnormal dentin mineralization was performed on the microradiographs. For this, the degree of mineralization was recorded along transect lines that were oriented perpendicular to the enamel-dentin-junction (EDJ) and extended from the EDJ to the dentin-pulp interface. Three such transect lines were analyzed per tooth. The first line was located at the level of the enamel-cementum junction (ECJ), the second 1 mm cuspal to the ECJ. A third line was located 3 mm above the ECJ in roe deer and 6 mm above the ECJ in red deer teeth to obtain data for corresponding areas of the tooth crowns, which are considerably larger in the red deer.

Along each transect line the percentages of the dentin exhibiting mineralization defects in the form of either hypomineralization (detectable as increased radiotranslucency relative to the surrounding dentin) or areas of interglobular dentin (IGD) were recorded. For a rough assessment of the timing of the impairment of dentin formation in the respective tooth, the dentin along the transect lines was divided into three portions of equal width, an outer (peripheral) third adjoining the enamel, a central third, and an inner third adjoining the pulp cavity. For each portion, the percentages of dentin exhibiting hypomineralization or presence of IGD were calculated over all three transect lines. Using the criteria given in table 1, the three dentin portions (outer, central, and inner) were assigned one of eight dentin lesion scores. It must, however, be emphasized that the three distinguished dentin portions can represent different formative periods depending on the individual tooth age. Thus e.g. the inner dentin portion of an older tooth reflects a later stage of (secondary) dentin formation than the corresponding portion of a

younger tooth. Based on external inspection, each tooth was also assigned a dental lesion score (Kierdorf and Kierdorf, 1999, 2000; Kierdorf et al. 1999).

Statistics

The relationship between the lesion scores of the three dentin portions and the dental lesion score of the respective tooth was analyzed by calculating Spearman rank order correlations between these variables for both species. P- levels < 0.05 indicated statistical significance.

Results

Bone fluoride concentrations

Bone fluoride concentrations were 149 mg/kg and 228 mg/kg in the two control roe deer and 323 mg/kg and 760 mg/kg in the two control red deer. Compared with these values, bone fluoride concentrations in the fluorotic deer were markedly increased, ranging between 1374 mg/kg and 3790 mg/kg in the roe deer and between 1719 mg/kg and 3411 mg/kg in the red deer (Fig.1).

Teeth from control dentitions

The dentin of premolars and molars from non-fluorotic mandibles exhibited regularly arranged dentinal tubules that in the upper and mid-flank regions of the tooth crowns followed an arched to S-shaped course from the EDJ to the pulpal border. In cervical crown regions the dentinal tubules followed a more horizontal course. In ground sections an incremental pattern was discernable in the dentin, with the incremental

lines oriented at approximately right angles to the course of the dentinal tubules (Fig. 2).

Dentin mineralization in the control teeth was rather homogeneous. In circumpulpal dentin, more highly mineralized peritubular dentin could be distinguished from the less mineralized intertubular dentin on SEM-BSE images (Fig. 3). In the mantle dentin, i.e. the first formed primary dentin, a small zone with IGD was regularly present close to the EDJ (Fig. 3). The vast majority of the scored dentin sectors of the control teeth exhibited either no (score 0) or only minor abnormalities (scores 1 or 2). However, in one of the control red deer with a low bone fluoride content of 323 mg/kg and no enamel fluorosis, dentin lesion scores of 3 and 4 were recorded.

Teeth from fluorotic dentitions

On macroscopic inspection, fluorotic teeth exhibited characteristic abnormalities including opacity and discoloration of the enamel, pathologically increased wear and presence of enamel defects (Fig. 4). In both, red and roe deer the first molars from fluorotic dentitions appeared (largely) normal, whereas the other cheek teeth showed fluorosis to different degrees. On histological inspection, the dentin of teeth from fluorotic dentitions exhibited mineralization defects of different severity. These presented as single or multiple zones of hypomineralized dentin or areas of interglobular dentin that were both oriented in parallel with the incremental lines (Figs. 5-8). IGD represents areas of severely disturbed mineralization, where the globular calcification centers (calcospherites) have failed to fuse, leaving behind patches of unmineralized dentin matrix (Figs. 9, 10). Since IGD denotes a complete failure of matrix mineralization, this abnormality was regarded to reflect a more severe impairment of the mineralization process than hypomineralized dentin. In

bright field images of ground sections, the air-filled interglobular spaces appeared dark, as they did also on microradiographs and SEM-BSE images due to the lack of mineral (Figs. 5-10).

The widths of the zones of impaired dentin mineralization varied considerably within a tooth and between teeth of the same individual. Also the extension of these zones along the vertical tooth axis showed marked intra-individual and inter-individual variation. In both species, teeth with a high enamel lesion score from mandibles with high bone fluoride concentrations often exhibited multiple zones of hypomineralized or interglobular dentin (Figs. 7, 8). Continuity between hypomineralized dentin zones and areas of IGD was observed on several occasions (Fig. 11).

A structural abnormality that was occasionally recorded in combination with dentin mineralization defects were parallel deviations (secondary curvatures) in the course of the dentinal tubules (Fig. 12). Such deviations from the normal tubule course were originally known as Owen's contour lines (Bradford, 1967; Frank and Nalbandian, 1989; Hillson, 2005), although this term has more recently also been used for defects of dentin mineralization (Frank and Nalbandian, 1989; Nanci, 2008). We here use the term in its original meaning. In several teeth it was possible to match Owen's contour lines in the dentin with pathologically enhanced striae of Retzius in the enamel. The accentuated markings in dentin and enamel converged at the EDJ, with the dentin markings reaching the EDJ slightly more cervically (Fig. 5).

The severity and distribution of dentin abnormalities varied between and within the three cheek teeth analyzed per fluorotic mandible. Dentin lesion scoring revealed that in all first molars from fluorotic red deer, the outer third of the dentin (next to the EDJ) was free from pathologic alterations (score 0) (Figs. 13, 14a). Similarly, in first molars of fluorotic roe deer, this dentin area showed either no

(score 0; 71%) or only slight mineralization defects not exceeding lesion score 2 (29%) (Fig. 14b). By contrast, the inner third of the dentin exhibited lesion scores between 4 and 7 in all red deer M₁s and in 71% of the roe deer M₁s (Figs. 14a,b). The central third of the dentin of these teeth showed intermediate lesion scores, with only 14% of the red deer and 28% of the roe deer M₁s exhibiting scores ≥ 3 in that area (Figs.14a,b). In contrast, the P₄s and M₃s from fluorotic roe and red deer mandibles exhibited marked abnormalities (lesion score ≥ 4) in most of the three dentin portions, with the inner third being most severely affected. Thus in red and roe deer all M₃s exhibited lesion score ≥ 4 in the inner third of their dentin. Lesion scores ≥ 4 were also recorded in 86% of the red deer P₄s and in 72% of the roe deer P₄s. In both species, the outer and central dentin thirds of the P₄s and M₃s exhibited considerably higher percentages of scores ≥ 4 than did the first molars (Figs. 14a,b).

In both species, lesion scores for the outer third of the dentin were positively correlated with the enamel lesion scores across the three teeth. In red deer, also the dentin lesion score of the central third of the dentin was positively correlated with the enamel lesion score, while no significant correlations existed between the enamel lesion scores and the lesion scores of the other dentin areas (Table 2).

Discussion

This is the first paper describing the distribution and quantifying the severity of dentinal lesion in teeth from deer exposed to excess fluoride. The main abnormalities in fluorotic dentin of deer were mineralization defects presenting as either hypomineralised areas or areas of IGD. Several experimental studies have previously reported similar observations in dentin of different species as a result of increased exposure to fluoride (Bauer, 1945; Yaeger and Eisenmann, 1963;

Eisenmann and Yaeger, 1969; Fejerskov et al., 1979; Appleton, 1992, 1994). These studies revealed characteristic differences in dentin response between acute and chronic administration of fluoride. Thus, acute fluoride administration by injection resulted in the formation of a hypermineralized band in the dentin that was followed by a broader zone of hypomineralized dentin (Eisenmann and Yaeger, 1969; Fejerskov et al., 1979; Appleton, 1992). This so called calciotraumatic response has been attributed to a transient increase in mineral formation due to high local fluoride concentrations, leading to an accelerated consumption of calcium ions, followed by a temporary local decrease in calcium concentration reflected by the hypomineralized band (Aoba and Fejerskov, 2002). In contrast, chronically increased fluoride exposure via diet or water causes different degrees of dentine hypomineralization or in a complete failure of matrix mineralization indicated by areas of IGD (Fejerskov et al., 1979; Appleton, 1994). In an experimental study by Appleton (1994), the extent of the IGD increased with the fluoride concentration in the diet. The findings of the present study are comparable to the dentin defects observed after chronically increased fluoride exposure.

Rojas-Sanchez et al. (2007) described sclerosis of dentinal tubules by a high density mineral and a compaction of the intertubular dentin in severe dental fluorosis in humans from an area with a high fluoride content of the drinking water. Obliteration of giant dentin tubules with a mineral having a higher density than the intertubular dentine has previously been reported to occur close to the occlusal surface in severely worn fluorotic deer teeth (Appleton et al. (2000). As already discussed by Appleton et al. (2000) for deer teeth, it is, however, open to question whether the dentin sclerosis observed in the fluorotic teeth represents a direct fluoride effect on dentin formation or whether the stimulus underlying tubular obliteration is the increased wear of fluorotic teeth.

The mechanisms underlying the hypomineralization of fluorotic dentin are not fully understood, but there is growing evidence that the transition from the unmineralized predentin to the mineralized dentin is disturbed in different ways. This transition involves the proteolytic remodeling of the initially secreted matrix as well as secretion of further matrix components. The resulting changes in the chemistry of the initially secreted dentin matrix are a prerequisite for mineralization (Embery et al., 2001; Moseley et al., 2003a,b). It has been demonstrated that fluoride leads to extracellular matrix alterations affecting both collagenous and noncollagenous components and that these changes cause an impairment of the mineralization process (Milan et al., 1999, 2004; Moseley et al. 2003a,b; Waddington et al., 2004). It was further shown that a number of enzymes (e.g. adenylate cyclase and alkaline phosphatase) involved in dentin mineralization are sensitive to fluoride. Milan et al. (1999) suggested that fluoride alters the biochemical structure of dentin phosphoproteins which may lead to disruption of dentin mineralization. Recently, Wurtz et al. (2008) reported that fluoride at a low (non cell-toxic) dose directly affects gene expression of odontoblasts *in vitro*. The aberrant gene expression is thought to cause impaired matrix formation and mineralization as well as impaired cell communication within the odontoblast layer.

Owen's contour lines have been interpreted to reflect a transient stop or slowing down of dentin matrix deposition from a systemic cause (Bradford, 1967). In line with this view we interpret the presence of Owen's contour lines in the dentin of the fluorotic deer teeth as indicative of a (fluoride-induced) transient impairment of matrix formation. This view is supported by the presence of accentuated striae of Retzius in the enamel that converge with the contour lines at the EDJ. Co-occurrence of disturbed matrix formation by ameloblasts and odontoblasts denotes a simultaneous impact on both cell types. The exact mechanism leading to the

characteristic parallel change in direction of the dentinal tubules is not known. We hypothesize that odontoblasts with a reduced secretory activity slow down their centripetal movement and that mechanical pressure exerted by the pulp tissue then causes a lateral deviation in the course followed by the cells.

It must be emphasized that none of the described structural abnormalities of the dentin is strictly pathognomonic of fluorosis. A wide variety of systemic influences, among them mineral (calcium, phosphorus and magnesium), hormonal (vitamin D) and general nutritional deficiencies (Jenkins, 1978) as well as the administration of various toxic substances other than fluoride (Eisenmann and Yaeger, 1972; Appleton, 1991, 1992, 1993) have been shown to disturb dentin formation in a way similar to fluoride. The diagnosis of the dentin abnormalities in the studied deer teeth as fluoride-induced is, however, clearly supported by the bone fluoride data. The low bone fluoride content in the control red deer showing higher dentin lesion scores and the lack of enamel fluorosis lead us to conclude that the dentinal lesions in this individual were not caused by fluoride.

The distribution and severity of the dentin abnormalities differed markedly both between the studied teeth of the fluorotic individuals as well as among the three different dentin portions distinguished within a single fluorotic tooth. Thus, in the first molars from fluorotic roe and red deer mandibles the first formed (primary) dentin (outer third) was mostly free of structural abnormalities or showed only minor lesions not exceeding score 2. By contrast, the later formed (inner third) dentin of these teeth frequently exhibited marked to severe lesions (scores ≥ 4). In the fluorotic P₄s and M₃s, all three dentin portions often exhibited lesion scores ≥ 4 , with the latest formed dentin (inner third) being most severely affected. These findings suggest a marked temporal variation in fluoride exposure during dentin formation in the studied teeth. The fact that the first formed dentin in the M₁s of fluorotic roe and red

deer is largely free of pathological alterations corresponds well with the finding that in these specimens also the enamel of the first molars is either not or only slightly affected by fluorosis (Kierdorf and Kierdorf, 2000; Kierdorf et al., 1993, 1996b). This leads us to conclude that primary dentin formation prior to the completion of amelogenesis in the M₁s is not significantly affected by fluoride. In both species, this stage of dental development covers the late prenatal and early postnatal period (Kierdorf and Kierdorf, 1989a; Brown and Chapman, 1990). Based on the study of fluorotic enamel defects it has previously been hypothesized that during these ontogenetic stages the developing dentition is protected against fluoride due to the action of different mechanisms. The supposed mechanisms are a partial placental diffusion barrier to fluoride and a low fluoride content in the milk of the lactating female caused by a blood-milk barrier to fluoride. Both mechanisms preclude excess fluoride uptake by the fetus and the young during the period of milk feeding. In addition, the high skeletal growth rate during the late fetal and early postnatal stages is thought to cause a rapid fluoride clearance from the blood, thereby reducing the fluoride exposure of the developing dental hard tissues (Kierdorf, 1988; Kierdorf et al., 1993, Kierdorf and Kierdorf, 2000).

Later stages of dentin formation in the first molars and the complete period of dentin formation in the fourth premolars and the third molars take place after weaning when the young from fluoride-polluted habitats feed upon fluoride-contaminated plant material. The resulting fluoride impact on dentin formation is considered the cause of the high lesion scores in the inner third of the dentin of the first molars and in the entire (primary and secondary) dentin of the fourth premolars and third molars from fluorotic mandibles. The distribution of the dentinal lesions as well as the positive correlation between the lesion score in the outer third of the dentin and the enamel lesion score in the teeth from fluorotic mandibles are

consistent with the hypothesis that dentin and enamel formation during the prenatal and early postnatal periods are protected against fluoride, while later (post-weaning) stages are not. So far this hypothesis has not been tested experimentally in deer. There is, however, experimental evidence from cattle supporting the view that there is a partial placental barrier to fluoride that acts to limit fluoride concentrations in fetal tissues (Shupe et al., 1992). Moreover, a limitation of the transfer of fluoride from blood to milk has been demonstrated in humans and cattle (Backer Dirks et al., 1974; Ekstrand et al., 1984).

Typically a roe or red deer living in a fluoride-polluted habitat throughout its life will exhibit a high bone fluoride content (reflecting lifelong skeletal fluoride incorporation) as well as dentin and enamel fluorosis in those teeth that developed after weaning. An animal exhibiting high bone fluoride levels but no enamel fluorosis is likely to have moved into the fluoride polluted area only after completion of amelogenesis in its permanent dentition. However, the inner dentin portion in the teeth of such an animal will exhibit fluoride-induced lesions. Recording structural abnormalities in dentin in addition to fluorotic defects of enamel does, therefore, considerably extend the ontogenetic time window for which fluoride effects on teeth can be analyzed, thereby allowing a more detailed reconstruction of fluoride exposure of an individual. This can be particularly important in areas with a high local variation of fluoride loads, such as in the vicinity of point sources of pollution (Kierdorf and Kierdorf, 2002).

The distribution of the fluorotic lesions in the dentin suggests a varying degree of impairment of dentinogenesis. This can hypothetically be related to a number of environmental and animal-related factors. Thus fluoride exposure of free-ranging deer will vary according to variation in atmospheric fluoride deposition and growth rates of the vegetation. Animal-related factors to be considered include

seasonal variation in activity pattern, number of feeding cycles per day and home-range size, as well as variation in growth rate and health status (Kierdorf et al., 1993). These external and internal factors will cause fluctuations in plasma fluoride levels and, in combination with a supposed variation in fluoride susceptibility of the dentin-forming cells lead to variation in distribution and severity of dentinal lesion.

Dentin apposition rates vary markedly throughout the life of a tooth (Dean and Scandrett 1995, 1996). Iinuma et al. (2004) reported average daily dentin apposition rates of $7.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$ (mean \pm SD) in first molars of sika deer (*Cervus nippon*) during the first six month of life. Labeling studies indicate that the rates of dentin formation and mineralization vary considerably between dentin areas of a tooth, with thicker dentin areas forming at a faster rate than thinner ones (Dean and Scandrett 1995; Iinuma et al. 2004; Smith et al. 2006). In the present study, the variation in the apposition rates of simultaneously formed dentin is demonstrated by the varying widths of dentin bands exhibiting mineralization defects.

In conclusion, the present study demonstrated that by analyzing dentinal lesions in addition to enamel defects the ontogenetic time window for which fluoride impacts on forming dental hard tissue can be recorded, is considerably extended. Including dentin histology into the analysis of fluoride-induced dental pathology thus allows a retrospective assessment of the pattern of fluoride exposure during the life of an individual. This adds to the significance of free-ranging deer as bioindicators of fluoride pollution.

Acknowledgements

The skilful technical assistance of D. Klosa (BSE-SEM imaging) and A. Benner and L. GrønkJaer (microradiography) is gratefully acknowledged.

References

- Aoba, T., Fejerskov, O., 2002. Dental Fluorosis: Chemistry and Biology. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13, 155-170.
- Appleton, J., 1991. The effect of lead acetate on dentine formation in the rat. Arch. Oral Biol. 36, 377-382.
- Appleton, J., 1992. Dentinogenesis and the calciotraumatic response to the injection of lead or fluoride ions. Scanning Microscopy 6, 1073-1081.
- Appleton, J., 1993. The structure of dentine after the injection of strontium chloride by backscattered electron imaging in the scanning electron microscope. Arch. Oral Biol. 38, 1-4.
- Appleton, J., 1994. Formation and structure of dentine in the rat incisor after chronic exposure to sodium fluoride. Scanning Microscopy 8, 711-719.
- Appleton, J., Chesters, J., Kierdorf, U., Kierdorf, H., 2000. Changes in the structure of dentine from cheek teeth chronically exposed to high levels of environmental fluoride. Cells Tissues Organs 167, 266-272.
- Backer Dirks, O., Jongeling-Eijndhoven, J.M.P.A, Flissebaalje, T.D., Gedalia I., 1974. Total and free ionic fluoride in human and cow's milk as determined by gas-liquid chromatography and the fluoride electrode. Caries Res. 8, 181-186.
- Bauer, W.H., 1945. Experimental chronic fluorine intoxication: effect on bones and teeth. Am. J. Orthodont. 31, 700-719.
- Bradford, E.W., 1967. Microanatomy and histochemistry of dentine. In: Miles, A.E.W. (ed.). Structural and chemical organization of teeth, Vol. II. Academic Press, New York , pp. 3-34.
- Brown, W.A.B., Chapman, N., 1991. Age assessment of red deer (*Cervus elaphus*) from a scoring scheme based on radiographs of developing permanent molariform teeth. J. Zool. Lond. 225, 85-97.

- Dean, M.C., 2006. Tooth microstructure tracks the pace of human life-history evolution. *Proc. Roy. Soc. B* 273, 2799-2808.
- Dean, M.C., Scandrett, A.E., 1995. Rates of dentine mineralisation in permanent human teeth. *Int. J. Osteoarchaeol.* 5, 349-358.
- Dean, M.C., Scandrett, A.E., 1996. The relation between long-period incremental markings in dentine and daily cross-striations in enamel in human teeth. *Arch. Oral Biol.* 41, 233-241.
- Eisenmann, D.R., Yaeger, J.A., 1969. Alterations in the formation of rat dentine and enamel induced by various ions. *Arch. Oral Biol.* 14, 1045-1064.
- Eisenmann, D.R., Yaeger, J.A., 1972. In vitro mineralization of hypomineralized dentine induced by strontium and fluoride in the rat. *Arch. Oral Biol.* 17, 987-999.
- Ekstrand, J., Spak, C.J., Falch, J., Afseth, J., Ulvestad, H., 1984. Distribution of fluoride to human breast milk following intake of high doses of fluoride. *Caries Res.* 18, 93-95.
- Embery, G., Hall, R.C., Waddington, R.J., Septier, D., Goldberg, M., 2001. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12, 331-349.
- Fejerskov, O., Yaeger, J.A., Thylstrup, A., 1979. Microradiography of the effect of acute and chronic administration of fluoride on human and rat dentine and enamel. *Arch. Oral Biol.* 24, 123-130.
- Fejerskov, O., Larsen, M.J., Richards, A.; Baelum, V., 1994. Dental tissue effects of fluoride. *Adv. Dent. Res.* 8, 15-31.
- Fejerskov, O., Ekstrand, J., Burt, B.A., (eds.). 1996. Fluoride in dentistry, second edition. Munksgaard, Copenhagen.

- Frank, R.M., Nalbandian, J., 1989. Structure and ultrastructure of dentine. In: Oksche, A., Vollrath, L. (eds.). Handbook of microscopic anatomy Vol. V/6: Springer, Berlin, pp. 173-247.
- Habermehl, K.H., 1985. Die Altersbestimmung bei Wild- und Pelztieren, second edition. Parey, Hamburg.
- Hillson, S., 2005. Teeth, second edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Inuma Y.M., Tanaka, S., Kawasaki, K., Kuwajima, T., Nomura, H., Suzuki, M., Ohtaishi, N., 2004. Dental incremental lines in sika deer (*Cervus Nippon*); polarized light and fluorescence microscopy of ground sections. J. Vet. Med. Sci. 66, 665-669.
- Jenkins, G.N., 1978. The physiology and biochemistry of the mouth, fourth edition. Blackwell, Oxford.
- Karstad, L., 1967. Fluorosis in deer (*Odocoileus virginianus*). Bull. Wildl. Dis. Assoc. 3, 42-46.
- Kierdorf, U., 1988. Untersuchungen zum Nachweis immissionsbedingter chronischer Fluoridintoxikation beim Reh (*Capreolus capreolus*). Z. Jagdwiss. 34, 192-204.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., 1989a. Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte des Gebisses beim Europäischen Reh (*Capreolus c. capreolus* L., 1758). Zool. Jb. Anat. 119, 37-75.
- Kierdorf, U., Kierdorf, H., 1989b. A scanning electron microscopic study of surface lesions in fluorosed enamel of roe deer (*Capreolus capreolus* L.). Vet. Pathol 26, 209-215.
- Kierdorf, H., Kierdorf U., 1997. Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. Cell Tissue Res. 289, 125-135.

- Kierdorf, U., Kierdorf, H., 1999. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environ. Monit. Assess.* 57, 265-275.
- Kierdorf, U., Kierdorf, H., 2000. Comparative analysis of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *J. Zool., Lond.* 250, 87-93.
- Kierdorf, U., Kierdorf, H., 2002. Assessing regional variation of environmental fluoride concentrations in Western Germany by analysis of antler fluoride content in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 99-104.
- Kierdorf, U., Kierdorf, H., Fejerskov, O., 1993. Fluoride-induced developmental changes in enamel and dentine of European roe deer (*Capreolus capreolus* L.) as a result of environmental pollution. *Arch. Oral. Biol.* 38, 1071-1081.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Sedlacek, F., Erdelen, M., 1996a. Mandibular bone fluoride levels and occurrence of fluoride induced dental lesions in populations of wild red deer (*Cervus elaphus*) from Central Europe. *Environ. Pollut.* 93, 75-81.
- Kierdorf, U.; Kierdorf, H., Sedlacek, F., Fejerskov, O., 1996b. Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus* L.) from a region with severe environmental pollution by fluorides. *J. Anat.* 188, 183-195.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Boyde, A., 1997. A quantitative backscattered electron imaging study of hypomineralization and hypoplasia in fluorosed dental enamel of deer. *Ann. Anat.* 179, 405-412.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Sedlacek, F., 1999. Monitoring regional fluoride pollution in the Saxonian Ore mountains (Germany) using the biomarker dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Sci. Total Environ.* 232, 159-168.

- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Richards, A., Sedlacek, F., 2000. Disturbed enamel formation in wild boars (*Sus scrofa* L.) from fluoride polluted areas in Central Europe. *Anat. Rec.* 259, 12-24.
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Richards, A., Josephsen, K., 2004. Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig. *Anat. Embryol.* 207, 463-474.
- Milan, A.M., Waddington, R.J., Embery, G., 1999. Altered phosphorylation of rat dentine phosphoproteins by fluoride *in vivo*. *Calcif. Tissue Int.* 64, 234-238.
- Milan, A.M., Waddington, R.J., Embery, G., 2001. Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity *in vitro* with potential implications for dentine mineralisation. *Arch. Oral Biol.* 46, 343-351.
- Milan, A.M., Sugars, R.V., Embery, G., Waddington, R.J., 2004. Dentinal proteoglycans demonstrate an increasing order of affinity to hydroxyapatite crystals during the transition from predentine to dentine. *Calcif. Tissue Int.* 75, 197-204.
- Moseley, R., Sloan, A.J., Waddington, R.J., Smith, A.J., Hall, R.C., Embery, G., 2003a. The influence of fluoride on the cellular morphology and synthetic activity of the rat dentine-pulp complex *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 46, 39-46.
- Moseley, R., Waddington, R.J., Sloan, A.J., Smith, A.J., Hall, R.C., Embery, G., 2003b. The influence of fluoride exposure on dentin mineralisation using an *in vitro* organ culture model. *Calcif. Tissue Int.* 73, 470-475.
- Nanci, A., 2008. Ten Cate's Oral histology: Development, structure, and function, seventh edition. Mosby-Elsevier, St. Louis.
- Piesco, N.P., 1994. Histology of dentin. In: Avery, J.K. (ed.). Oral development and histology, second edition. Thieme, New York, pp. 242-260.

- Reuter, F., Kohl, H., Wienhaus, O., 1997. Fluor und Waldökosystem. Allg. Forstz. 52, 252-255.
- Rojas-Sanchez, F., Alaminos, M., Campos, A., Rivera, H., Sanchez-Quevedo, M.C., 2007. Dentin in severe fluorosis : a quantitative histochemical study. J. Dent. Res. 86, 857-861.
- Shupe, J.L.; Olson, A.E., 1983. Clinical and pathological aspects of fluoride toxicosis in animals. In: Shupe, J.L., Peterson, H.B., Leone, N.C. (eds.). Fluorides: effects on vegetation, animals and humans. Paragon Press, Salt Lake City, pp.319-338.
- Shupe, J.L.; Bagley, C.V.; Karram, M.H.; Callan, R.J., 1992. Placental transfer of fluoride in Hostein cows. Vet. Hum. Toxicol. 34, 1-4.
- Smith, A.J., Cassidy, N., Perry, H., Bégue-Kirn, C., Ruch, J.-V-, Lesot, H., 1995. Reactionary dentinogenesis. Int. J. Dev. Biol. 38, 273-280.
- Smith, T.M., Reid, D.J., Sirianni, J.E., 2006. The accuracy of histological assessments of dental development and age at death. J. Anat. 208, 125-138.
- Suckling, G., Thurley, D.C., Nelson, D.G.A., 1988. The macroscopic and scanning electron-microscopic appearance and microhardness of the enamel, and the related changes histological changes in the enamel organ of erupting sheep incisors resulting from a prolonged low daily dose of fluoride. Arch. Oral Biol. 33, 361-373.
- Suttie, J.S., Dickie, R., Clay, A.B., Nielsen, P., Mahan, W.E., Baumann, D.P., Hamilton, R.J., 1987. Effects of fluoride emissions from a modern primary aluminum smelter on a local population of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Wildl. Dis. 23, 135-143.
- Suttie J.W., Faltin, E.C., 1971. The effects of a short period of ingestion on dental fluorosis in cattle. Am. J. Vet. Sci. 34, 217-222.

- Veron, M.H., Couble, M.L., Magloire, H., 1993. Selective inhibition of collagen synthesis by fluoride in human pulp fibroblasts in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 53, 38-44.
- Vikøren, T., Stuve, G., 1996. Fluoride exposure in cervids inhabiting areas adjacent to aluminum smelters in Norway. II. Fluorosis. *J. Wild. Dis.* 32, 181-189.
- Waddington, R.J., Moseley, R., Smith, A.J., Sloan, A.J., Embery, G., 2004. Fluoride-induced changes to proteoglycan structure synthesised within the dentine-pulp complex in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 142-151.
- Walton, R.E., Eisenmann, D.R., 1975. Ultrastructural examination of dentine formation in rat incisors following multiple fluoride injections. *Arch. Oral Biol.* 20, 485-488.
- Wurtz, T., Houari, S., Mauro, N., MacDougall, M., Peters, H., Berdal, A., 2008). Fluoride at non-toxic dose affects odontoblasts gene expression in vitro. *Toxicology* 249, 26-34.
- Yaeger, J.A., 1963. Microscopy of the response of rodent dentine to injected fluoride. *Anat. Rec.* 145, 139-147.
- Yaeger, J.A., 1966. The effects of higher fluoride diets on developing enamel and dentine in the incisors of rats. *Am. J. Anat.* 118, 665-684.
- Yaeger, J.A., Eisenmann, D., 1963. Response of rodent dentin to various doses of fluoride, strontium and parathyroid extract. *J. Dent. Res.* 42, 1208-1216.
- Zemek, F., Heřman, M., Kierdorf, H., Kierdorf, U., Sedlacek, F., 2006. Spatial distribution of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from North Bohemia (Czech Republic) and its relationship with environmental factors. *Sci Total Environ.* 370, 491-505.

Figures

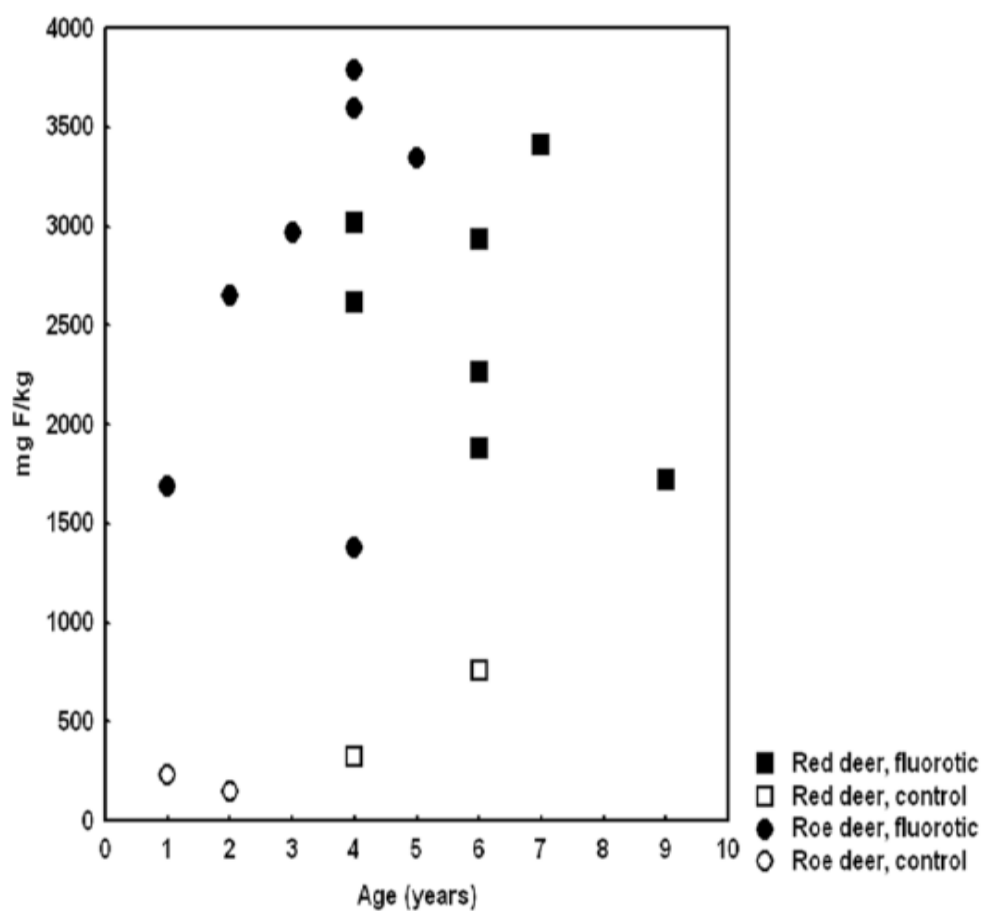


Fig. 1. Relationship between estimated age and fluoride concentration in mandibular bone (mg/kg dry weight) of control and fluorotic red and roe deer.

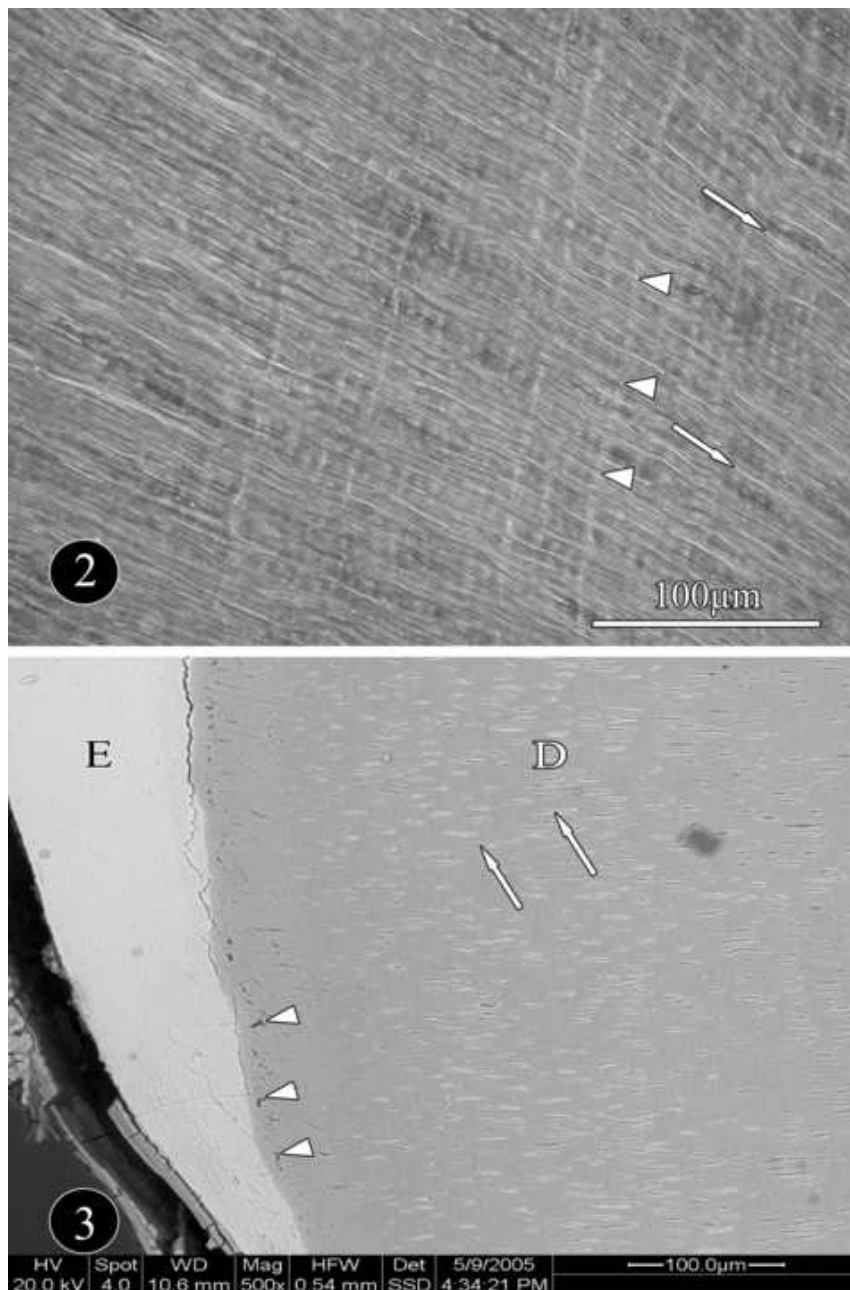


Fig.2. Incremental markings in the dentin of a mandibular fourth premolar of a control roe deer. Arrowheads mark an Andresen line; arrows indicate direction of dentinal tubules. Ground section, transmitted light with phase contrast.

Fig. 3. SEM-BSE image of an axiobuccolingually sectioned mandibular third molar of a control roe deer. Arrowheads mark IGD in mantle dentin; arrows indicate peritubular dentin that exhibits a higher mineral content than intertubular dentin. D: dentin, E: enamel.

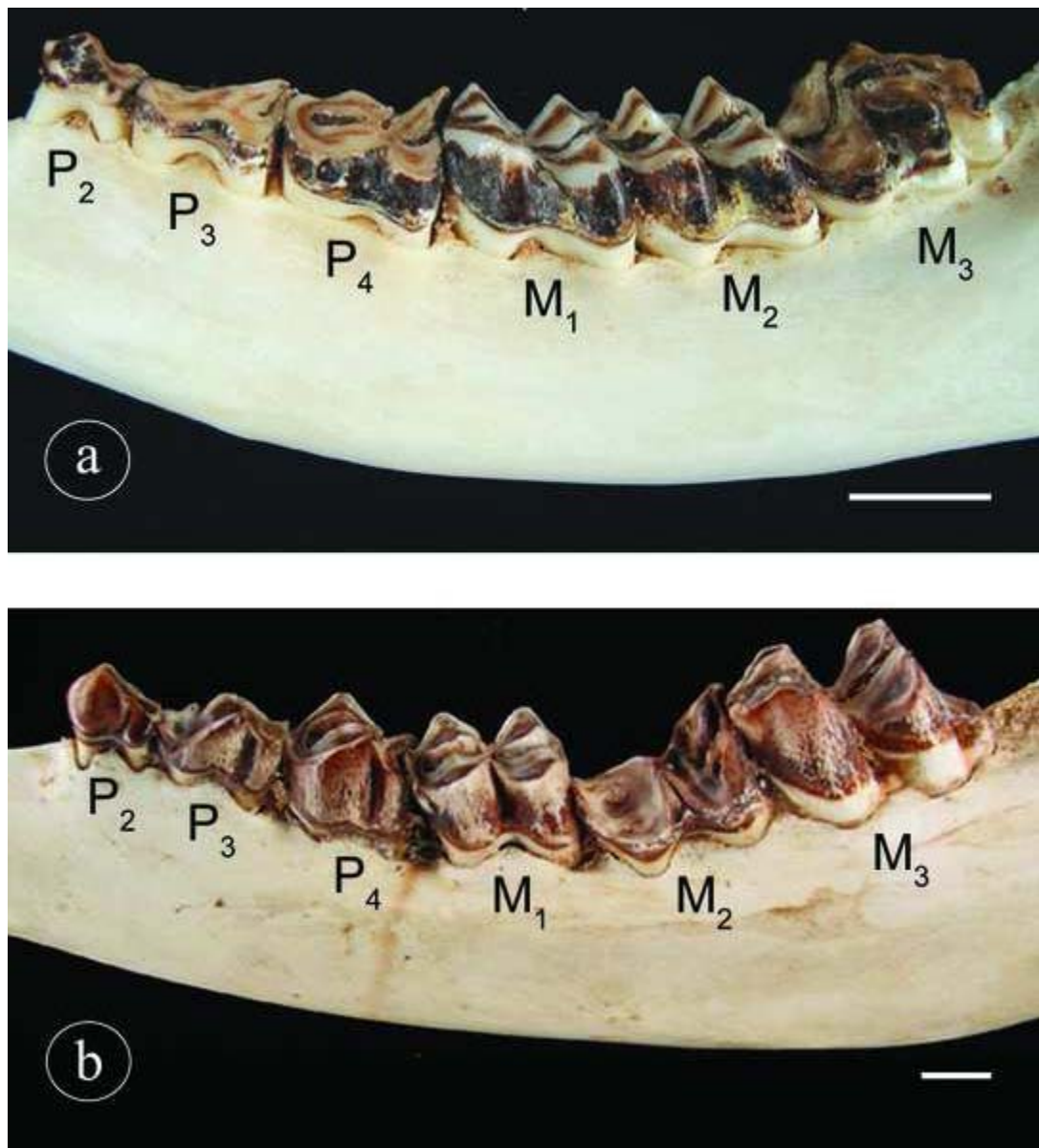


Fig. 4. Rows of left mandibular cheek teeth of a roe deer (a) and a red deer (b) exhibiting dental fluorosis. Note normal appearance of the M1 in both specimens, while the other teeth show different degrees of fluorosis (least so in the roe deer M2). Bone fluoride concentrations are 2965 mg/kg dry weight in the roe deer and 2262 mg/kg dry weight in the red deer. Bars represent 1 cm.

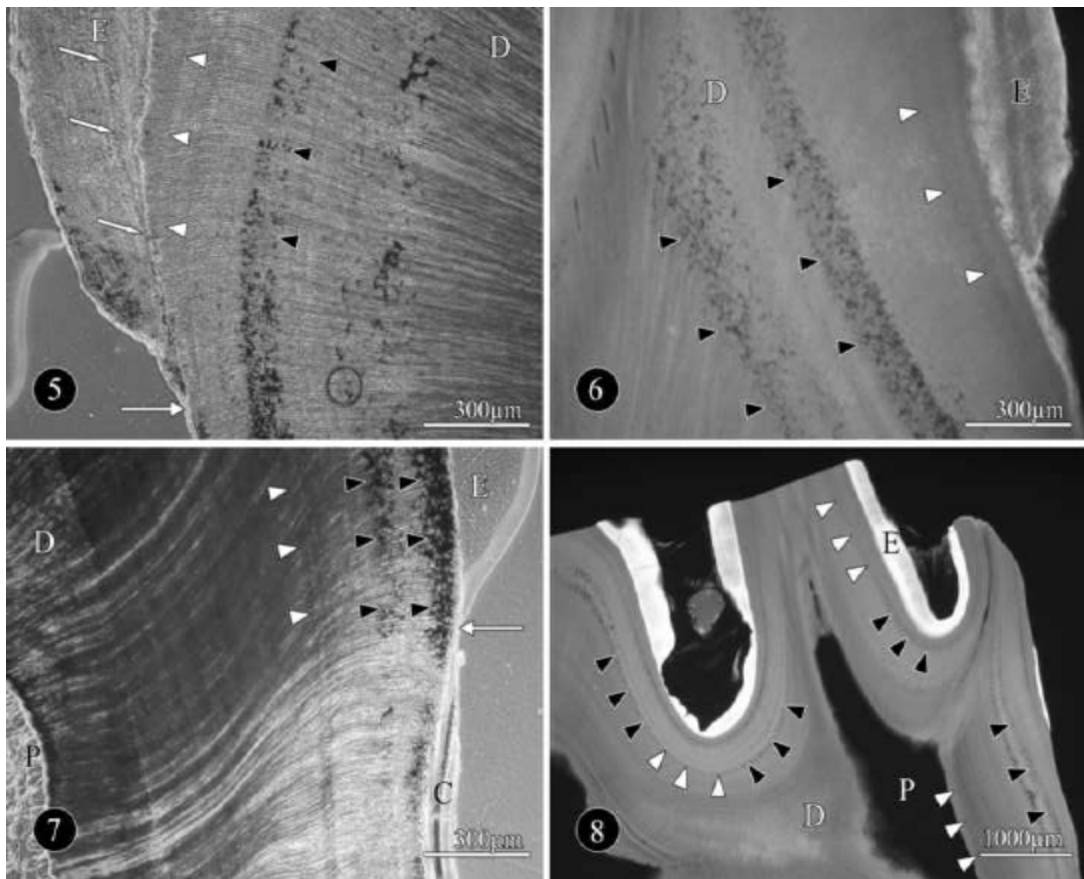


Fig. 5. Axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular third molar of a roe deer. Black arrows mark inner border of a broad zone with IGD, white arrowheads indicate an Owen's contour line in the dentin (D). Small arrows denote an accentuated stria of Retzius in the enamel (E), converging with the Owen's contour line at the EDJ. Large arrow indicates cervical enamel border. Ground section, transmitted light with phase contrast.

Fig. 6. Microradiograph of axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular third molar of a roe deer, same tooth as Fig. 4. Black arrowheads mark inner borders of two zones with IGD, white arrowheads indicate a band of hypomineralized dentin. Note severe hypomineralization of enamel (E). D: dentin.

Fig. 7. Axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular fourth premolar of a roe deer presenting multiple bands of hypomineralization in the dentin (D), one of which is indicated by white arrowheads. Black arrowheads denote zones with IGD, arrow indicates cervical enamel border. E: enamel, C: cementum, P: pulp cavity. Ground section, transmitted light with phase contrast.

Fig. 8. Microradiograph of axiomesiodistally sectioned fluorotic mandibular fourth premolar of a roe deer. Multiple bands of defective mineralization are present in the dentin (D). An individual band can comprise both hypomineralized stretches (white arrowheads) as well as stretches of IGD (black arrowheads). Note hypomineralization and hypoplasia of the enamel (E). P: pulp cavity.

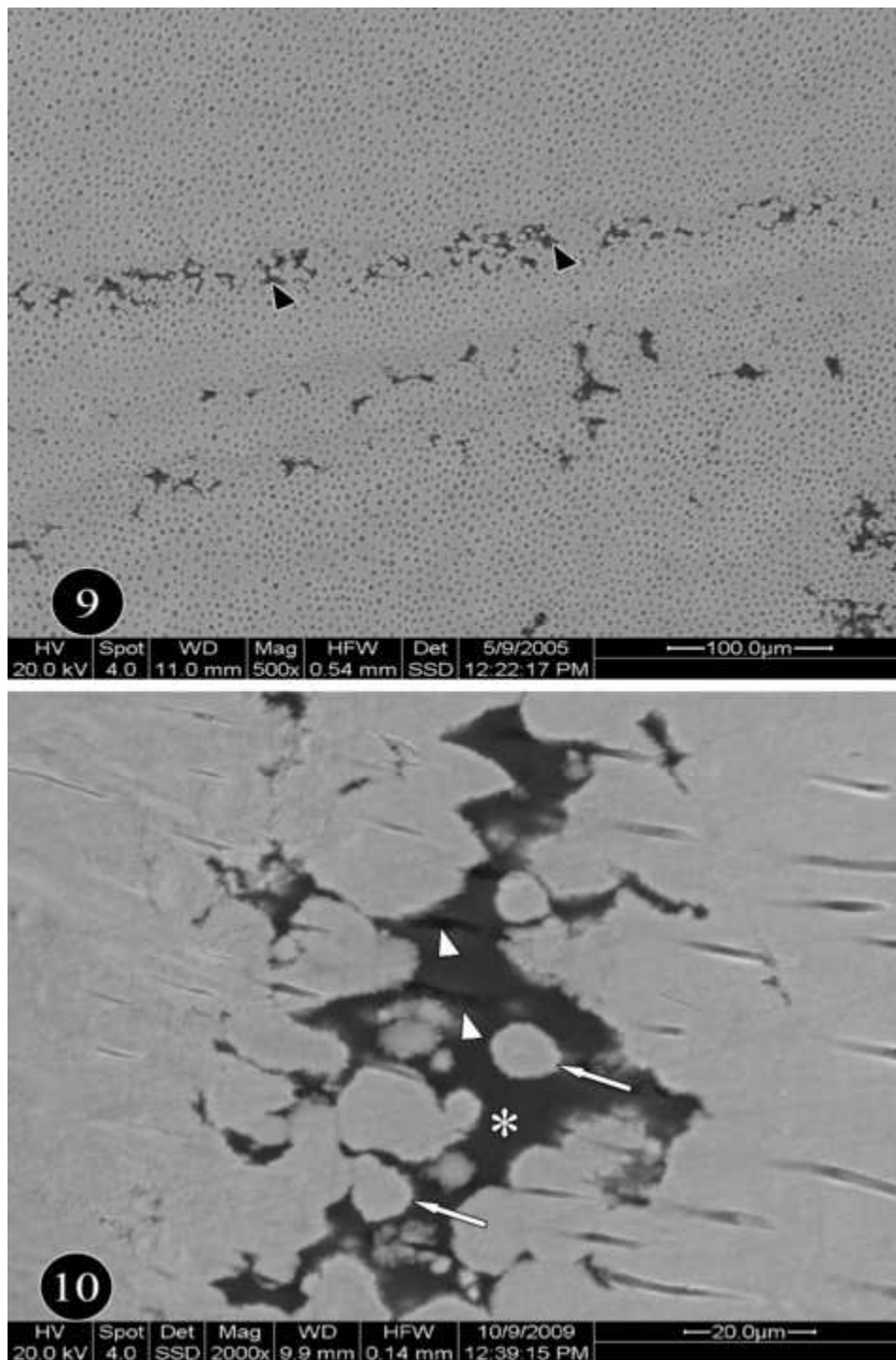


Fig. 9. SEM-BSE image of the dentin of an axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular fourth premolar of a red deer exhibiting zones with IGD, one of which is indicated by arrowheads.

Fig. 10. SEM-BSE image of the dentin of an axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular fourth premolar of a roe deer. Arrows: globular calcospherites; asterisk: IGD; arrowheads: dentinal tubules running through IGD.

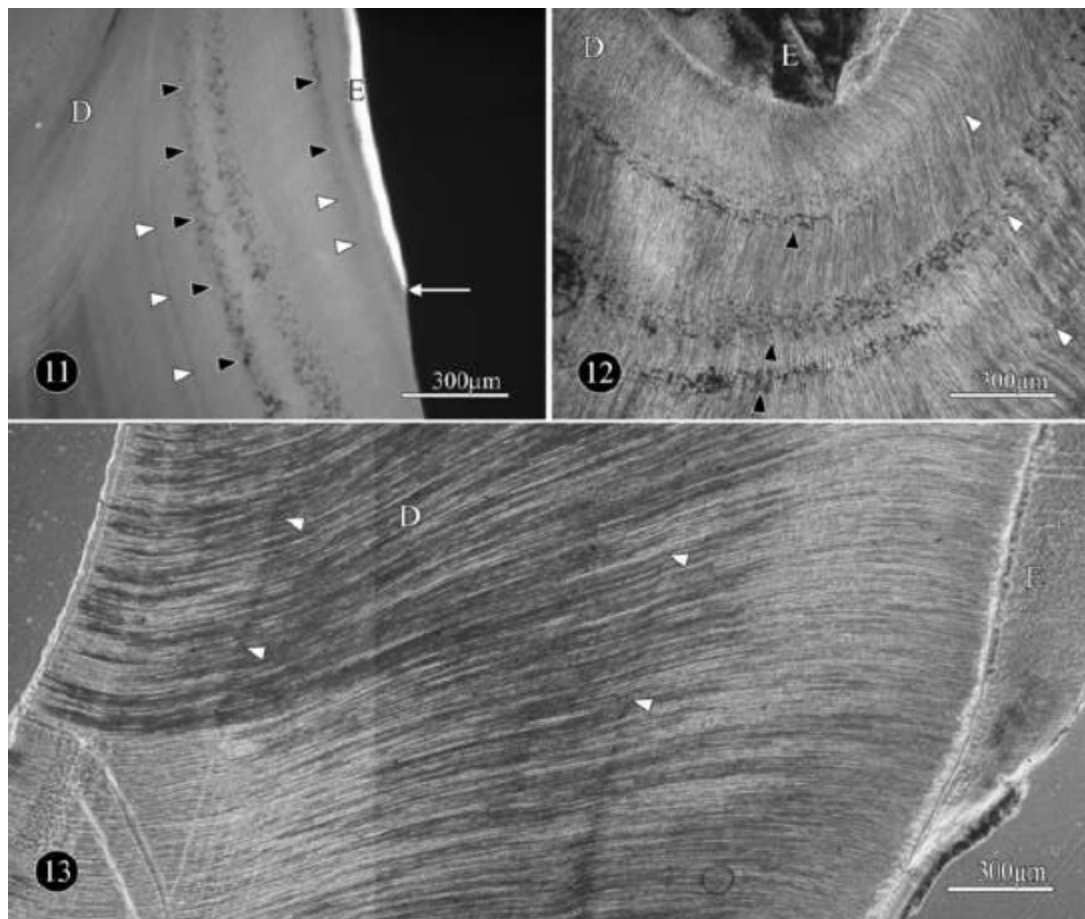


Fig. 11. Microradiograph of an axiomesiodistally sectioned fluorotic mandibular fourth premolar of a roe deer. Hypomineralized dentin bands (white arrowheads) and areas of IGD (black arrowheads) are indicated. D: dentin; E: enamel; arrow: cervical enamel border.

Fig. 12. Axiobuccolingually sectioned fluorotic mandibular third molar of a roe deer. White arrowheads indicate Owen's contour lines in the dentin (D), black arrowheads indicate zones with IGD. E: enamel.

Fig. 13. Axiobuccolingually sectioned mandibular first molar of a fluorotic red deer. The outer portion of the dentin (D) adjoining the enamel (E) shows a normal structure, whereas the central and inner portions of the dentin exhibit hypomineralized bands (white arrowheads). Ground section, transmitted light with phase contrast.

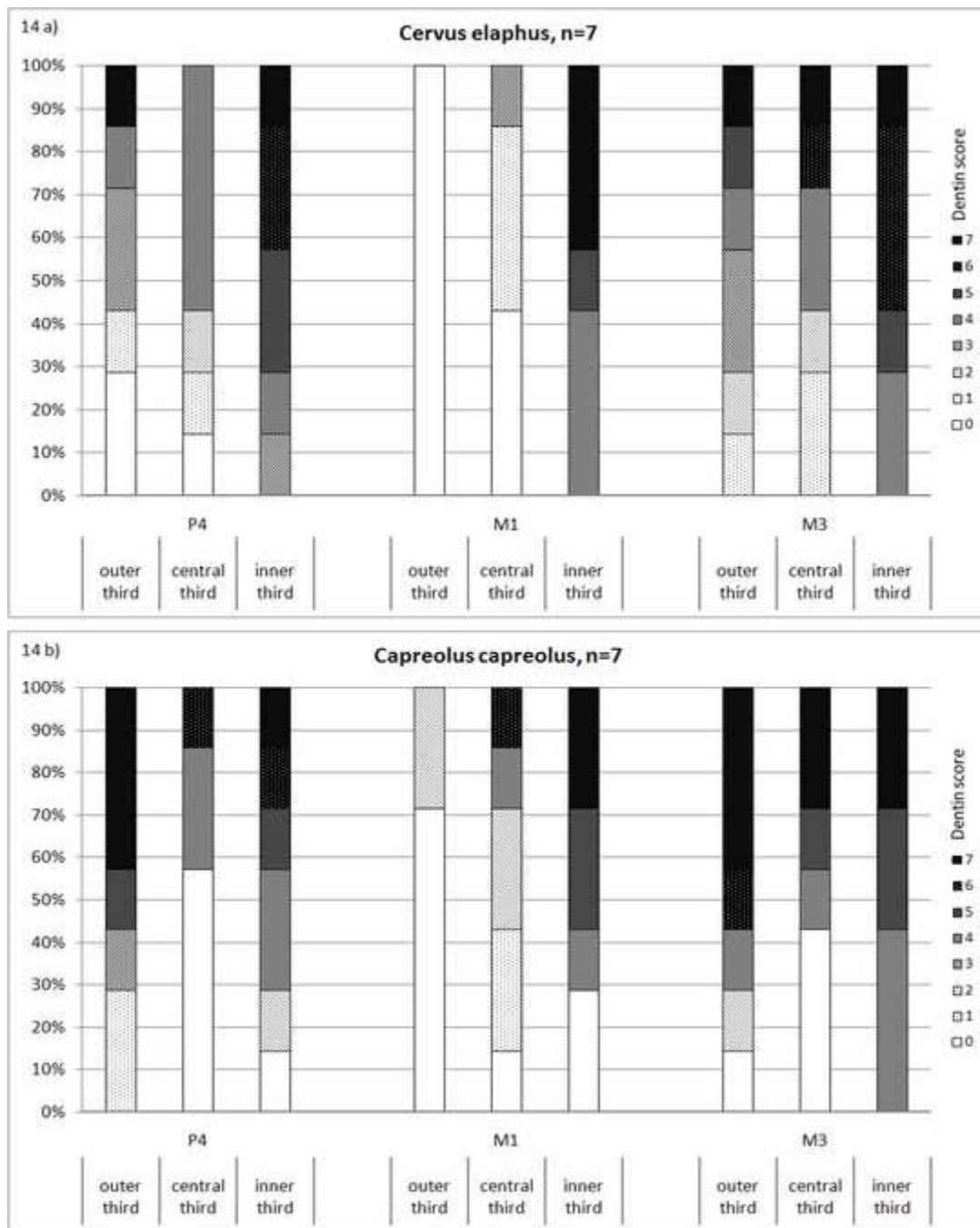


Fig. 14. Frequencies of lesion scores (0-7) in the outer, central and inner thirds of the dentin of P4s, M1s , and M3s of fluorotic red deer (a) and roe deer (b).

Dentin lesion score	Percentage of dentin with mineralization defects	Percentage of interglobular dentin
0	0 -15	<10
1	>15 -25	<10
2	>25 -35	<10
3	>35 -45	<10
4	>45	<10
5	>45	10 -20
6	>45	>20 -30
7	>45	>30

Table 1. Scoring system for classification of dentin mineralization defects (hypomineralized and interglobular dentin) in permanent premolars and molars of fluorotic roe and red deer dentitions. The percentages given are those for the (combined) three transect lines per tooth. Details of the assessment process are given in Materials and Methods.

Dentin area	Roe deer	Red deer
Outer third	$r_s = 0.74, p < 0.001$	$r_s = 0.58, p = 0.006$
Central third	$r_s = 0.22, p = 0.34$	$r_s = 0.57, p = 0.007$
Inner third	$r_s = -0.10, p = 0.65$	$r_s = 0.005, p = 0.98$

Table 2. Relationship, expressed as Spearman rank correlation, between lesion scores for different dentin areas and enamel lesion scores in cheek teeth (P4, M1, M3, $n = 7$, each) of roe and red deer (21 teeth per species).

This is a post-print (i.e. final draft post-refereeing) self-archived version of the original publication by Elsevier which is available at www.elsevier.com under the doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.003

Fluoride concentration in dentin as a biomarker of fluoride intake in European roe deer (*Capreolus capreolus*) – an electron-microprobe study

Heiko Richter^a, Uwe Kierdorf^a, Alan Richards^b, Frank Melcher^c, Horst Kierdorf^{a*}

^aDepartment of Biology, University of Hildesheim, Marienburger Platz 22, 31141 Hildesheim, Germany

^bSchool of Dentistry, University of Aarhus, Vennelyst Boulevard, 8000 Aarhus C, Denmark

^cFederal Institute for Geosciences and Natural Resources (BGR), Stilleweg 2, 30655 Hannover, Germany

*Corresponding author. Tel.: +49 (0) 5121883913; fax: +49 (0) 5121883911

E-mail address: kierdorf@uni-hildesheim.de (H. Kierdorf)

Abstract

Objective:

Fluoride concentration in dentin has been recommended as the best marker for the level of chronic fluoride intake and the most suitable indicator of an individual's total body burden of fluoride. We analyzed fluoride concentrations in the dentin of cheek teeth of European roe deer from fluoride polluted habitats to retrospectively assess the level of fluoride uptake into the tissue. Thereby, we tested the hypothesis of the existence of mechanisms that limit fluoride intake of individuals and fluoride exposure of forming dental hard tissues during the late fetal and early postnatal periods in the species.

Design:

Using electron microprobe analysis, fluoride profiles were obtained on sectioned P₄s, M₁s, and M₃s from individuals exhibiting pronounced dental fluorosis. Fluoride concentrations were compared between early formed (peripheral) and late formed (juxtapulpal) dentin both within single teeth and among the three different teeth studied.

Results:

Peripheral dentin of the M₁, which is formed during the late fetal and early postnatal periods, exhibited markedly lower fluoride concentrations than juxtapulpal dentin of the same tooth and both, peripheral and juxtapulpal dentine of P₄ and M₃ that are formed post-weaning.

Conclusions:

Our study provides strong support for the hypothesis that in the European roe deer the prenatal and early postnatal (pre-weaning) stages of dental development are (largely) protected against exposure to excess fluoride. This is attributed to the operation of certain protective mechanisms during these periods.

Keywords: bioindication, environmental pollution, fluoride profiles, teeth

Introduction

In humans and other mammals it has been demonstrated that fluoride from ingested soluble compounds is rapidly and extensively absorbed from the gastrointestinal tract.¹ Fluoride is removed from plasma by mineralized tissue uptake or urinary excretion, the latter being the major route for elimination of fluoride from the body. Fluoride uptake from plasma is especially effective in the case of forming mineralized tissues, and approximately 99% of the fluoride retained in the body is present in mineralized tissues.^{1,2}

Intake of excess amounts of fluoride can induce acute, subacute or chronic fluoride poisoning.^{1,3,4} A key manifestation of chronic fluoride toxicity during dental development is dental fluorosis.³⁻⁵ Dental fluorosis (also termed enamel fluorosis or mottled enamel) is a developmental abnormality that presents as aberrations from normal enamel structure and mineralization.⁶⁻⁸ Excess fluoride does, however, not only negatively affect amelogenesis, but also the formation of other dental hard tissues. Thus, several authors have described mineralization defects in dentin caused by exposure to excess fluoride.⁹⁻¹²

Occurrence of dental fluorosis is indicative of a toxic fluoride effect on the enamel forming cells (ameloblasts) and can therefore be used as a biomarker of chronic fluoride poisoning during the period of tooth crown formation.^{5,8,13-15} It has been demonstrated that both the secretory and maturation stages of enamel formation can be disturbed by fluoride action.^{5,8,16,17} Impairment of the function of secretory ameloblasts causes abnormalities in the microstructure of enamel as well as enamel hypoplasia.^{8,17} Fluoride interference with enamel maturation is seen as the cause of the hypomineralization that is typical for fluorotic enamel.^{5,8,16-18}

Several diagnostic scoring systems are available to assess the prevalence and severity of dental fluorosis in humans.^{7,13,14,19} The relationship between increased fluoride exposure and severity of dental fluorosis has also been studied in wild deer, and the structural abnormalities of fluorotic deer enamel have been described in greater detail.^{15,20-24} In the European roe deer (*Capreolus capreolus*), a characteristic variation in the severity of fluorotic aberrations among the permanent mandibular cheek teeth is observed that has been related to the developmental sequence of the dentition.^{25,26} Thus, mandibular first molars from fluorotic dentitions show either no or, in a few percent of cases, only very minor dental fluorosis, whereas the enamel of the later-forming permanent premolars and third molars regularly exhibits more pronounced fluorotic aberrations. In the European roe deer, crown formation of the M₁ starts prenatally and is complete shortly after weaning, whereas crown formation in the permanent premolars and the M₃ starts after weaning,²⁷ when the animal feeds on (fluoride-contaminated) plants. This led us to suggest that during the late fetal and early postnatal periods, protective mechanisms exist that prevent excessive fluoride exposure of the developing teeth of roe deer from areas with high levels of environmental fluoride. The protective mechanisms discussed so far are a partial placental diffusion barrier and a blood-milk barrier to fluoride, as well as the swift clearance of fluoride from plasma by the rapidly growing skeleton in the late fetal and early postnatal periods.^{20,25,26}

Fluoride causes enamel aberrations only during the period of amelogenesis, since after the completion of crown formation the ameloblasts are lost upon eruption of the tooth. Thus, any excess fluoride intake after tooth eruption will not lead to dental fluorosis. Contrary to enamel, dentin formation continues after tooth eruption, and analyzing dentin in addition to enamel therefore provides an opportunity to extend the period for which fluoride effects on individuals can be recorded by studying their teeth. In a previous microscopic and microradiographic study, we analyzed the severity and

distribution of mineralization defects in the dentin of cheek teeth (P₄s, M₁s, and M₃s) from fluorotic dentitions of European roe deer and red deer (*Cervus elaphus*).²⁸ While the entire dentin of fourth premolars and third molars from fluorotic deer dentitions exhibited areas of defective mineralization, the first molars of these individuals exhibited defects only in the central and inner (juxtapulpal) dentin portions. By contrast, the first formed dentin of the first molars, i.e., the peripheral dentin located adjacent to the enamel, was largely free of pathological alterations. These findings suggest that the early period of dentin formation in the first molars, which like amelogenesis in the M₁ takes place during the late fetal and early postnatal periods of life, is protected against excess fluoride exposure. The above finding was taken as circumstantial evidence supporting the existence of the presumed protective mechanisms against excess fluoride exposure during this ontogenetic period.²⁸ However, since none of the structural abnormalities seen in the dentin of the deer teeth is pathognomonic for fluoride toxicity, a direct proof of the existence of these protective mechanisms is still lacking.

The fluoride concentration in dentin, especially coronal dentin, has been recommended as the best marker for the level of chronic fluoride intake and the most suitable indicator of an individual's total body burden of fluoride.^{2,12,29-31} The reason for this is that, in contrast to bone, dentin is not remodeled, and during its lifelong formation continues to take up fluoride in relation to an individual's exposure. In contrast to the porous fluorotic enamel that is known to accumulate greater amounts of fluoride from the oral cavity posteruptively,^{2,14} dentin is moreover largely protected against fluoride exposure from the oral cavity by the covering enamel and cementum, and fluoride concentration in dentin is thus considered to reflect the fluoride that has been incorporated through systemic uptake.^{2,12,29,30}

As has been demonstrated in several studies, the reconstruction of temporal trends of fluoride uptake into dental hard tissues is possible if appropriate methods (micro-

abrasion, serial etching, or microprobe techniques) are used that allow determination of fluoride concentration with a high spatial resolution.³¹⁻³⁹ Therefore, the aim of the present study was to utilize the spatial variation of fluoride concentration in the dentin of cheek teeth of European roe deer from fluoride-polluted habitats in order to retrospectively assess fluoride uptake into the tissue. These data allowed us to test our hypothesis of the existence of protective mechanisms limiting fluoride exposure of forming teeth during certain ontogenetic periods.

1. Materials and methods

1.1. Specimens, tooth scoring, and bone fluoride determination

The study was performed on the mandibular cheek teeth of eight male European roe deer (*Capreolus capreolus*) that all exhibited marked to severe dental fluorosis (Table 1, Fig. 1). The mandibles had been collected by local hunters in a fluoride-polluted region in Northern Bohemia (Czech Republic) during the early 1990s. At that time, the study area was exposed to severe atmospheric fluoride pollution resulting mainly from emissions of lignite-burning thermal power plants located in the North-Bohemian brown coal basin.^{21,40,41} Mandibular cheek teeth of a male European roe deer that had been killed in the early 1990s in an area of western Germany (Bergisches Land, federal state of North Rhine-Westphalia) not exposed to elevated fluoride deposition served as controls.

All inspected mandibles, which had been routinely cleaned by the hunters, possessed a complete set of permanent cheek teeth. Age-at-death of the deer was assessed based on dental wear.⁴² In fluorotic individuals, only the wear stage of the first molar (M₁) was used for age estimation, because the other cheek teeth exhibited increased wear as is typical for fluorotic deer teeth (Fig. 1). Estimated mean age of the

fluorotic individuals was 4.1 years (range: 1–8 years), the estimated age of the control individual was 1 year. For each of the fluorotic dentitions, a dental lesion index of fluorosis (DLI) was calculated to quantify the degree of macroscopic defects in the teeth. For that, each of the six permanent teeth ($P_2 - P_4$ and $M_1 - M_3$) present in the left mandibular cheek tooth row was assigned a lesion score of either 0 (no dental fluorosis) or 1 to 5 (increasing severity of dental fluorosis) according to the criteria listed in Table 2. The numerical value of the DLI is the sum of the lesion scores of the six permanent cheek teeth.^{15,26,40}

For determination of fluoride concentration in the mandible, a sample of cortical bone was obtained with an electric drill and precisely weighed samples of the bone powder were digested in perchloric acid. The solution was then buffered and analysed for fluoride using a fluoride ion-specific electrode (Orion model 96-09, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Fluoride concentrations are expressed as milligrams per kilogram (= ppm) of dried bone. Individual values given represent arithmetic means of the results of two analyses per bone sample.

1.2. *Preparation and electron probe analysis of the teeth*

To cover the whole formative period of the post-canine permanent dentition, three teeth (P_4 , M_1 , and M_3) were studied from each mandible. The teeth were extracted from the left side and embedded in epoxy resin (Epofix, Struers, Copenhagen, Denmark).

Subsequently they were longitudinally sectioned in a bucco-lingual or mesio-distal plane using a rotary saw with a water-cooled diamond-coated blade (Woco 50, Conrad, Clausthal-Zellerfeld, Germany). One of the resulting blocks was polished on a motorized rotary polisher (Labopol-5, Struers), using diamond suspensions (Diapro, Struers) with 9 and 3 μm particle diameters, respectively, and a final chemical polishing

step (OP-S Colloidal Silica suspension, Struers). Prior to examination, the polished surfaces were carbon coated.

The teeth were analyzed for fluoride and calcium with an electron microprobe (SX 100, Cameca, Paris, France) operated at an accelerating voltage of 10 keV and a sample current of 40 nA. Element concentrations were recorded on the polished surfaces along horizontal transect lines that were located 2 mm above the enamel-cementum-junction and ran from the enamel surface to the dentin-pulp-interface, with intervals of 120 μm between successive measuring spots. Prior to analysis, the position of these spots (diameter of 10 μm) along the transect lines was defined using a microscopic device (DMRX DL/AL, Leica, Wetzlar, Germany) with an integrated camera and a computer-controlled point logger system. The first measuring spot was located in the outermost enamel directly underneath the enamel surface.

The detection limit for calcium, measured on a PET crystal, and fluoride, detected on a PC1 multilayer crystal, was approximately 0.03 wt%. For the statistical analysis of differences in fluoride concentrations within and between teeth, obtained fluoride values below the detection limit were set to half the detection limit, i.e., to a value of 0.015 wt%. For calibration of the instrument, a fluoroapatite standard with known element concentrations (Ca = 38,94%; P = 17,86%; F = 3,70%) was used.

To detect temporal variation of fluoride uptake during dentinogenesis (intratooth variation of fluoride incorporation), fluoride concentrations in the early-formed, peripheral (close to enamel) and the late-formed, juxtapulpal dentin of each tooth were compared. Fluoride concentration in the early-formed dentin was calculated as the arithmetic mean of the concentrations of the first three dentinal measuring spots adjacent to the enamel-dentin-junction. Fluoride concentration in the late-formed dentin was calculated as the respective mean of the three most juxtapulpally located dentinal measuring spots on a transect. In some specimens, small clefts occurred in the dentin

that had formed during drying of the tissue. Occasionally, measurement spots partly or complete coincided with such clefts. Such cases could be clearly identified since they always resulted in a very marked drop of the measured calcium concentration. In these cases, the respective value was excluded, and instead the value from the next measuring spot in, respectively, centripetal or centrifugal direction on the transect was included in the analysis.

1.3. Statistics

In the fluorotic dentitions, fluoride concentrations in the peripheral (early-formed) and juxtapulpal (late-formed) dentin portions of each tooth type (intratooth variation) were compared with the Wilcoxon matched pairs test (two-tailed), using $\alpha = 0.05$ as the critical significance level. Variation in fluoride concentrations of the two dentin areas among the three tooth groups (P₄s, M₁s, M₃s) studied (intertooth variation) was analyzed by Friedman ANOVA. If a significant effect was indicated, post-hoc comparisons using the Wilcoxon matched pairs test (two-tailed) with Bonferroni α -adjustment for three comparisons were performed. To achieve significance at the 0.05 level, the *P*-values from the latter tests had to be lower than the adjusted α -value of $0.05/3 = 0.0167$. All statistical tests were performed with the software package STATISTICA, version 8 (StatSoft, Tulsa OK, USA).

2. Results

Bone fluoride concentration in the unfluorosed control individual was low (149 mg F⁻/kg dry wt), indicating only minor exposure to fluoride. Much higher bone fluoride concentrations (between 1686 and 3790 mg F⁻/kg dry wt; Table 1) were recorded for the specimens from North Bohemia. Bone fluoride concentration in the fluorosed 1-yr old roe deer was about 11 times higher than in the equally 1-yr old control individual.

The above findings indicate that the animals from North Bohemia had lived under conditions of severely increased fluoride exposure. This conclusion is corroborated by the high DLI values (ranging from 13 to 22) recorded for the analyzed dentitions of these individuals (Table 1).

All M₁s from the fluorotic dentitions were assigned a tooth score of zero, i.e. they did not show dental fluorosis. By contrast, all P₄s and M₃s from the fluorotic dentitions exhibited dental fluorosis. Six of the eight P₄s were assigned a score of 5, one each a score of 3 and 4. All but one (score 4) of the M₃s were scored 5 (Table 1).

Fluoride concentrations in the dentin of the three analyzed teeth from the control individual were very low, being in the range of or below the detection limit (0.03 wt%) of the microprobe (data not shown). By contrast, in the teeth from fluorotic dentitions much higher dentin fluoride values were recorded, except for the peripheral (early-formed) dentin areas of the first molars. Thus in five of the eight analyzed M₁s, recorded values for this dentin area were below the detection limit of 0.03 wt%. Figure 2 shows an example of the fluoride and calcium profiles in the P₄ from a fluorotic dentition. In all cases, fluoride concentrations showed a marked fluctuation along the measuring transects. In enamel, values were highest near the surface and steeply declined towards the EDJ, while in the dentin there was a tendency for fluoride concentrations to increase in the late-formed, juxtapulpal dentin. Thus, in both tissues fluoride values tended to be highest near the respective exchange surfaces. Fluoride concentrations in the outermost enamel of fluorotic teeth ranged between 0.13 and 1.09 wt% in the P₄s and between 0.17 and 0.64 wt% in the M₃s.

Fluoride concentration in the peripheral (early-formed) dentin portions of mandibular first molars from fluorotic dentitions was markedly lower than that in juxtapulpal (late-formed) dentin of these teeth, the difference between the two areas being statistically significant ($z = 2.52$, $P = 0.012$). In contrast, no significant

differences in fluoride levels between the two dentin areas were observed for mandibular fourth premolars ($z = 0.56$, $P = 0.58$) and third molars ($z = 0.42$, $P = 0.67$) from the fluorotic dentitions (Table 3, Fig. 3). The ratios for the maximum fluoride concentration measured in juxtapulpal dentin to the maximum concentration in peripheral dentin were 1.26:1 for the P_4 , 1.20:1 for the M_3 , and 6.37:1 for the M_1 (Table 3).

No significant difference in fluoride levels occurred between the juxtapulpal dentin portions of the three teeth ($\chi^2 = 0$, $df = 2$, $P = 1$), whereas for peripheral dentin, a significant difference was observed ($\chi^2 = 9.25$, $df = 2$, $P = 0.0098$) (Table 3, Fig. 3). The post-hoc test revealed a significant difference between P_4 and M_1 for peripheral dentin ($z = 2.52$, $P = 0.012$), whereas the difference between P_4 and M_3 ($z = 0.14$, $P = 0.89$) was not significant. When applying Bonferroni α -adjustment, also the difference in fluoride concentration of peripheral dentin between M_1 and M_3 , although pronounced, was not significant ($z = 2.24$, $P = 0.025$).

Discussion

This is the first study that systematically analyzed the variation of fluoride levels in the dentin of cheek teeth from fluorotic dentitions of European roe deer. Thus far, only one other study, also using electron microprobing, reported on fluoride distribution in enamel and dentin of fluorotic and non-fluorotic teeth from this species;⁴³ however, the data were not analyzed statistically.

In both the present study and our previous investigation,⁴³ highest fluoride concentrations were recorded near the respective exchange surfaces of enamel and dentin. Thus, in enamel the outer regions regularly exhibited the highest fluoride levels, while in the dentin highest fluoride concentrations tended to occur close to the pulpal border. The sometimes very high fluoride levels observed in the outer enamel of

severely fluorotic teeth match similar observation in human teeth and can be ascribed to posteruptive fluoride uptake into the highly porous subsurface enamel of fluorotic teeth, subsequent to posteruptive loss of surface enamel.^{2,5,14}

Dentin fluoride concentrations showed marked variation in the teeth from the fluorotic dentitions, both within the M₁ (intratooth variation) as well as between peripheral dentin areas of different teeth (intertooth variation). Thus, the early formed dentin of first molars exhibited much lower fluoride concentrations than the later formed dentin of these teeth. Fluoride levels in the early formed dentin of the M₁s were also markedly lower than fluoride concentrations in the respective dentin areas of the P₄s and M₃s of the individuals. In contrast to the M₁s, no significant difference in fluoride levels between early and late formed dentin existed in P₄s and M₃s, with high fluoride concentrations recorded for both dentin areas.

Fluoride concentrations in mineralized tissues may vary due to different factors, including the (seasonally varying) level of systemic fluoride uptake, the duration of exposure, and a number of interrelated factors such as the stage of tissue development and tissue growth rates, vascular supply, surface area and porosity of the respective tissue.² Our findings indicate a marked temporal variation of fluoride incorporation into the dentin of the analyzed teeth. The data show that during early dentin formation of the first molars, which takes place in the late fetal and early postnatal periods of life,²⁷ fluoride incorporation into the tissue had been low. The results of our electron-probe study are evidence of a low plasma fluoride level during these periods in roe deer living in a fluoride-polluted environment.

High fluoride concentrations were recorded in the juxtapulpal dentin of the first molars and in peripheral and juxtapulpal dentin of fourth premolars and third molars from fluorotic dentitions. This indicates elevated plasma fluoride levels during the mineralization of these dentin areas, which takes place during later life. These findings

are in accordance with results of previous studies reporting high dental fluorosis scores in the later forming fourth premolars and third molars of fluorotic roe deer dentitions.²⁶ Also factors other than varying plasma fluoride levels may have contributed to the observed variation of fluoride concentration along the measuring transects. The fluoride accumulated in dentin is initially acquired during the process of crystal growth and thereafter by way of exchange. Thus, during early dentin formation, the rapidly forming tissue avidly incorporates fluoride by accretion during mineralization. This rapid accumulation will, however, occur over only a rather short period of time. Therefore, the inner dentin may exhibit a relatively lower fluoride concentration than later formed dentin that due to its much slower growth rate is present much longer at or near the inner exchange surface and may thus passively absorb and accumulate large amounts of fluoride if plasma fluoride levels are high.² In this context we wish to emphasize that the juxtapulpal dentin portions of the analyzed teeth may represent different periods of dentin formation dependent on the age-at-death of the respective individual and the corresponding tooth age.

Our findings on fluoride distribution in the dentin of cheek teeth from fluorotic roe deer are in accordance with the results of our previous study on the distribution of mineralization defects in these teeth.²⁸ In that study we could demonstrate that the early formed dentin of first molars from fluorotic roe deer dentitions was (largely) free from mineralization defects. In contrast, the juxtapulpal dentin of the first molars and the entire dentin of the fourth premolars and third molars from these dentitions exhibited areas of hypomineralized and interglobular dentin, suggestive of fluoride interference with the process of dentin mineralization. However, since none of the observed dentin abnormalities is pathognomonic for fluoride toxicity, the contribution of factors other than excess fluoride to the mineralization defects could not be ruled out with certainty in that study.

The results of the present study demonstrate that the dentin areas that were characterized by the presence of marked mineralization defects in our previous study also exhibit elevated fluoride concentrations. By contrast, the early formed dentin of first molars from fluorotic dentitions, which were previously shown to be entirely or largely free from such mineralization defects, was found to exhibit only low fluoride levels. The findings of the present study thus provide strong support for the hypothesis that in the roe deer the late fetal and early postnatal stages of dental development are protected against fluoride action, which is attributed to the operation of certain protective mechanisms during these periods.

Thus far, the existence of the postulated protective mechanisms has not been demonstrated experimentally in deer. There is, however, experimental evidence from cattle supporting the notion of a partial placental diffusion barrier to fluoride that acts to limit fluoride concentrations in fetal plasma.⁴⁴ Also, an only limited transfer of fluoride from blood to milk has been demonstrated in humans and cattle.^{45,46} Moreover, as has been demonstrated in humans, the calcium content of milk will lower the bioavailability of any fluoride ingested along with this milk.⁴⁷ In addition to milk, roe deer fawns start to take up increasingly larger amounts of plant material from four weeks post partum onwards.²⁶ It is assumed that during the transition period from pure milk feeding to pure plant feeding, the presence of milk in the digestive tract will somewhat reduce the bioavailability of the fluoride ingested via contaminated food plants. Another mechanism reducing fluoride exposure of early-forming teeth (like the first molars) is the swift clearance of fluoride from plasma by the rapidly growing skeleton of the late fetus and the fawn up to its first winter.^{20,25,26} That the growing skeleton is an effective sink for fluoride is evidenced by the high bone fluoride concentration recorded in the 1 yr old fluorotic roe deer from North Bohemia. In contrast, teeth developing post-weaning as well as dentin forming during later life, i.e. after completion of the

permanent dentition, will be exposed to higher levels of fluoride, due mainly to higher dietary fluoride intake when exclusively feeding on (fluoride-contaminated) plants. In addition, release of previously skeletally deposited fluoride into the plasma as a result of normal bone turnover may add to the increased fluoride exposure of forming dentin in older individuals.

In conclusion, the present study has demonstrated that microprobe analysis of fluoride concentrations in permanent cheek teeth from fluorotic roe deer dentitions enables a retrospective assessment of temporal variation in dentinal fluoride uptake and thereby of plasma fluoride levels of an individual. Our results thus corroborate the view²⁹⁻³¹ that fluoride concentrations in dentin are a good marker of chronic fluoride intake and the most suitable biomarker of the long-term body burden of fluoride. The findings of the present investigation provide clear evidence that in roe deer from fluoride-polluted habitats fluoride exposure of developing teeth is limited during certain ontogenetic periods.

Acknowledgements

We thank Jerzy Lodziak, BGR Hannover, for his assistance with the microprobe analyses.

REFERENCES

- 1 Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. 2nd ed. Basel: Karger; 1996.
- 2 Robinson C, Kirkham J and Weatherell JA. Fluoride in teeth and bone. In: Fejerskov O, Ekstrand J and Burt BA editors. Fluoride in dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996:69-87.

- 3 Shupe JL, Peterson HB and Leone NC. Fluorides - Effects on vegetation, animals and humans. Salt Lake City: Paragon Press; 1983.
- 4 World Health Organization. Fluorides. Environmental Health Criteria 227. Geneva: WHO; 2002.
- 5 Aoba T and Fejerskov O. Dental Fluorosis: Chemistry and Biology. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:155-170.
- 6 Pindborg JJ. Pathology of the dental hard tissues. Philadelphia: WB Saunders;1970.
- 7 Fejerskov O, Manji F, Baelum V and Møller JJ. Dental fluorosis - a handbook for health workers. Copenhagen: Munksgaard; 1988.
- 8 Bronckers ALJJ, Lyaruu DM and DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. J Dent Res 2009;88:77-893.
- 9 Appleton J. Dentinogenesis and the calciotraumatic response to the injection of lead or fluoride ions. Scanning Microscopy 1992;6:1073-1081.
- 10 Appleton J. Formation and structure of dentine in the rat incisor after chronic exposure to sodium fluoride. Scanning Microscopy 1994;8:711-719.
- 11 Moseley R, Waddington RJ, Sloan AJ, Smith AJ, Hall RC, and Embery G. The influence of fluoride exposure on dentin mineralization using an *in vitro* organ culture model. Calcif Tissue Int 2003;73:470-475.

- 12 Vieira A, Hancock R, Dumitriu M, Schwartz M, Limeback H and Gryn timer M. How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization. *J Dent Res* 2005;84:951-957.
- 13 DenBesten PK. Dental fluorosis: its use as a biomarker. *Adv Dent Res* 1994;8:105-110.
- 14 Fejerskov O, Richards A and DenBesten PK. The effect of fluoride on tooth mineralization. In: Fejerskov O, Ekstrand J and Burt BA editors. *Fluoride in dentistry*. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996:112-152.
- 15 Kierdorf U and Kierdorf H. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environ Monit Assess* 1999;57:265-275.
- 16 Richards A, Kragstrup J, Josephsen K and Fejerskov O. Dental fluorosis developed in postsecretory enamel. *J Dent Res* 1988;65:1406-1409.
- 17 Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A and Josephsen K. Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig. *Anat Embryol* 2004;207:463-474.
- 18 Sharma R, Tsuchiya M., Skobe Z, Tannous BA and Bartlett JD. The acid test of fluoride: how pH modulates toxicity. *PLoS ONE* 2010;5:e10895.

- 19 Kingman A. Current techniques for measuring dental fluorosis: issue in data analysis. *Adv Dent Res* 1994; 8:56-65.
- 20 Kierdorf U, Kierdorf H and Fejerskov O. Fluoride-induced developmental changes in enamel and dentine of European roe deer (*Capreolus capreolus* L.) as a result of environmental pollution. *Arch Oral Biol* 1993;38:1071-1081.
- 21 Kierdorf H, Kierdorf U, Sedlacek F and Erdelen M. Mandibular bone fluoride levels and occurrence of fluoride induced dental lesions in populations of wild red deer (*Cervus elaphus*) from Central Europe. *Environ Pollut* 1996;93:75-81.
- 22 Kierdorf U, Kierdorf H, Sedlacek F and Fejerskov O. Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus*) from a region with severe environmental pollution by fluorides. *J Anat* 1996;188:183-195.
- 23 Kierdorf H and Kierdorf U. Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1997;289:125-135.
- 24 Kierdorf H, Kierdorf U and Boyde A. A quantitative backscattered electron imaging study of hypomineralization and hypoplasia in fluorosed dental enamel of deer. *Ann Anat* 1997;179:405-412.
- 25 Kierdorf U. Untersuchungen zum Nachweis immissionsbedingter chronischer Fluoridintoxikation beim Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Z Jagdwiss* 1988;34:192-204.

- 26 Kierdorf U and Kierdorf H. Comparative analysis of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*): interdental variation and species differences. J Zool Lond 2000;250:87-93.
- 27 Kierdorf H and Kierdorf U. Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte des Gebisses beim Europäischen Reh (*Capreolus c. capreolus* L., 1758). Zool Jb Anat 1989;119:37-75.
- 28 Richter H, Kierdorf U, Richards A and Kierdorf H. Dentin abnormalities in cheek teeth of wild red and roe deer from a fluoride-polluted area in Central Europe. Ann Anat 2010;192:86-95.
- 29 Vieira APGF, Hancock R, Limeback H, Maia R and Grynpas MD. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? J Dent Res 2004;83:76-80.
- 30 Vieira APGF, Mousny M, Maia R, Hancock R, Everett ET and Grynpas MD. Assessment of teeth as biomarkers for skeletal fluoride exposure. Osteoporos Int 2005;16:1576-1582.
- 31 Rojas-Sanchez F, Alaminos M, Campos A., Rivera H and Sanchez-Quevedo MC. Dentin in severe fluorosis: a quantitative histochemical study. J Dent Res 2007;86:857-851.
- 32 Tötdal B, Hals E. Electron probe study of human and red deer cementum and root dentin. Scand J Dent Res 1985;93:4-12.

- 33 Nakagaki H, Koyama Y, Sakakibara Y, Weatherell JA and Robinson C. Distribution of fluoride across human dental enamel, dentine and cementum. *Arch Oral Biol* 1987;32:651-654.
- 34 Kato K, Nakagaki H, Sakakibara Y, Kameyama Y, Weatherell JA and Robinson C. Distribution of fluoride in the enamel of rat incisors examined by an abrasive microsampling technique. *Arch Oral Biol* 1988;33:653-656.
- 35 Nelson DGA, Coote GE, Vickridge IC and Suckling G. Proton microprobe determination of fluorine profiles in the enamel and dentine of erupting incisors from sheep given low and high daily doses of fluoride. *Arch Oral Biol* 1989;34:419-429.
- 36 Angmar-Månsson B, Lindh U and Whitford GM. Enamel and dentin fluoride levels and fluorosis following single fluoride doses: a nuclear microprobe study. *Caries Res* 1990;24:258-262.
- 37 Richards A, Likimani S, Baelum V and Fejerskov O. Fluoride concentrations in unerupted fluorotic human enamel. *Caries Res* 1992;26:328-332.
- 38 Richards A, Coote GE and Pearce EIF. Proton probe and acid etching for determining fluoride profiles in porous porcine enamel. *J Dent Res* 1994;73:644-651.
- 39 Suckling G, Coote GE, Cutress TW and Gao J. Proton microprobe assessment of the distribution of fluoride in the enamel and dentine of developing central incisors of sheep and changes induced by daily fluoride supplements. *Arch Oral Biol* 1995;40:439-446.

- 40 Kierdorf H, Kierdorf U and Sedlacek F. Monitoring regional fluoride pollution in the Saxonian Ore mountains (Germany) using the biomarker dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). Sci Total Environ 1999;232:159-168.
- 41 Zemek F, Herman M, Kierdorf H, Kierdorf U and Sedlacek F. Spatial distribution of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from North Bohemia (Czech Republic) and its relationship with environmental factors. Sci Total Environ 2006;370:491-505.
- 42 Habermehl KH. Altersbestimmung bei Wild- und Pelztieren. 2nd ed. Hamburg: Parey; 1985.
- 43 Kierdorf U, Kierdorf H and Krefting ER. Elektronenstrahl-Mikrosonden-Untersuchung des Fluorgehaltes und der Fluorverteilung in Schmelz und Dentin fluorotischer und nicht fluorotischer Backenzähne des Rehes (*Capreolus capreolus* L.). Z Jagdwiss 1991;37:232-239.
- 44 Shupe JL, Bagley CV, Karram MH and Callan RJ. Placental transfer of fluoride in Holstein cows. Vet Hum Toxicol 1992;34:1-4.
- 45 Backer-Dirks O, Jongeling-Eijndhoven JMPA, Flissebaalje TD and Gedalia I. Total and free ionic fluoride in human and cow's milk as determined by gas-liquid chromatography and the fluoride electrode. Caries Res 1974;8:181-186.

46 Ekstrand J, Spak CJ, Falch J, Afseth J and Ulvestad H. Distribution of fluoride to human breast milk following intake of high doses of fluoride. *Caries Res* 1984;18:93-95.

47 Shulman ER, Vallejo M. Effect of gastric contents on the bioavailability of fluoride in humans. *Pediatr Dent* 1990;12:237-240

Figures

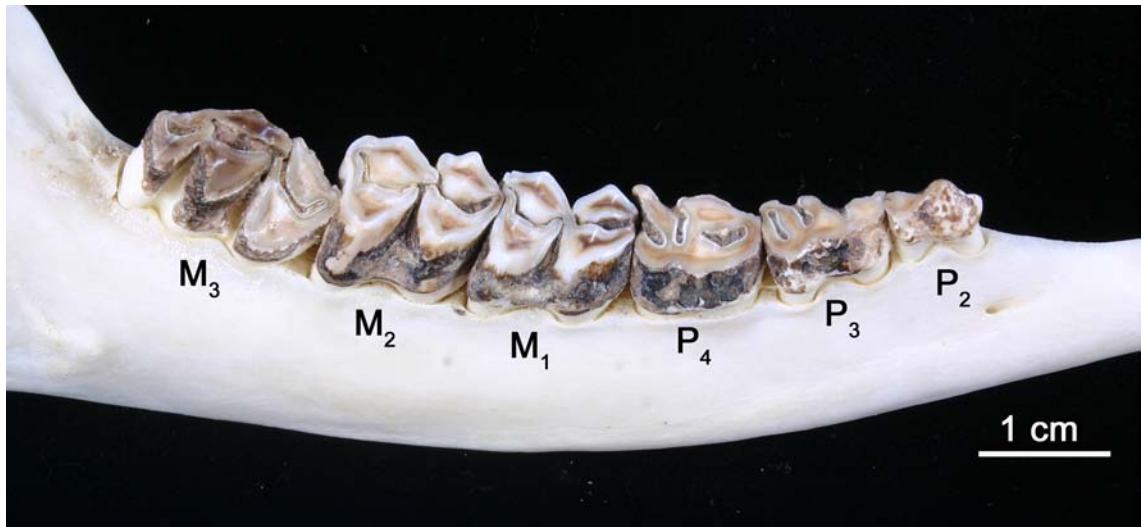


Figure 1. Row of right mandibular cheek teeth (bucco-occlusal view) of a roe buck exhibiting severe dental fluorosis (specimen # 39, bone fluoride content 3591 mg/kg dry wt, DLI = 22, note normal appearance of M₁).

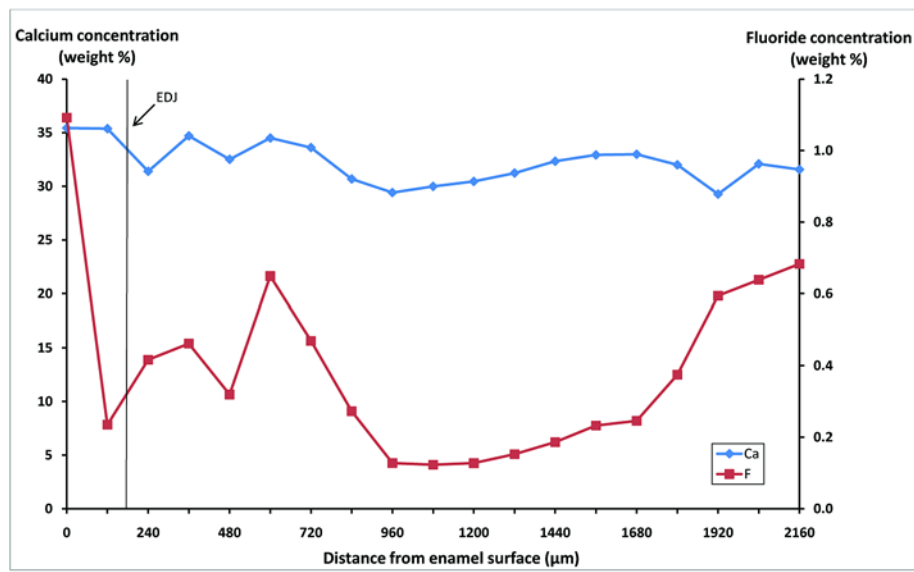


Figure 2. Calcium and fluoride profiles in a bucco-lingually sectioned fluorotic P₄ of a roe deer (specimen # 37, bone fluoride content 2965 mg/kg dry wt, DLI = 20). EDJ = enamel-dentin-junction; enamel surface to left, pulp surface to right. Position 0 on the x-axis refers to the measuring point in outermost enamel, located directly underneath the surface.

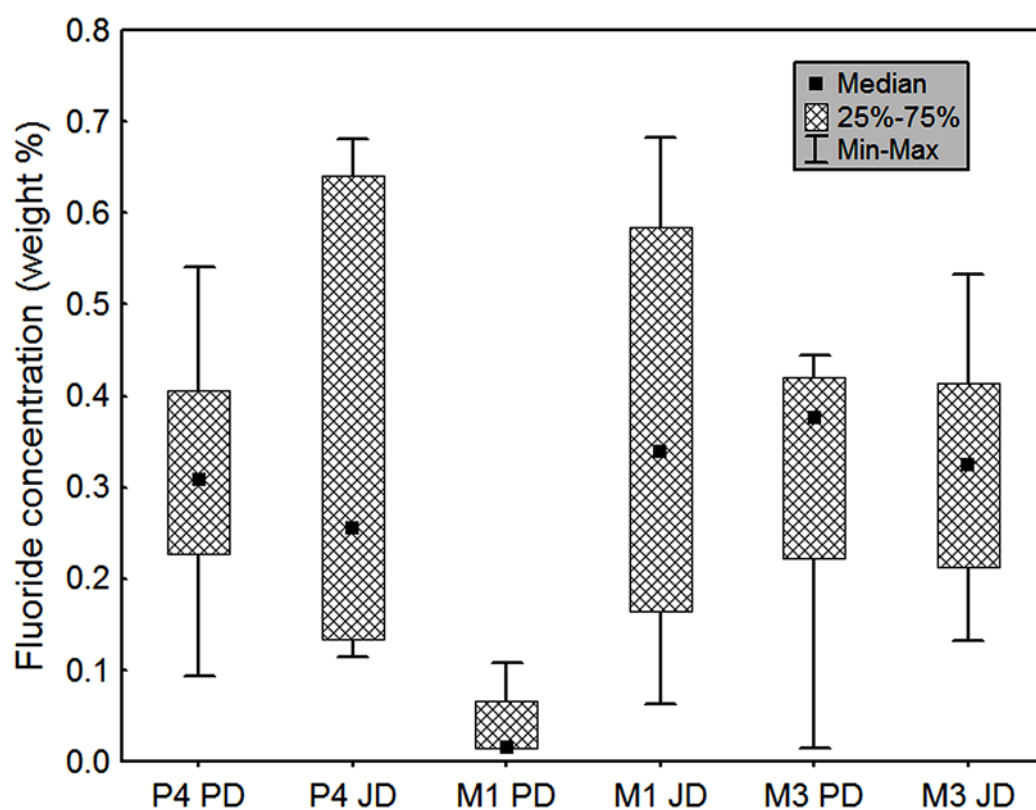


Figure 3. Fluoride concentration in peripheral dentin (PD) close to enamel and juxtapulpal dentin (JD) of P₄s, M₁s and M₃s from fluorotic roe deer dentitions (n = 8). Note low fluoride concentrations in peripheral dentin of M₁.

Tables

Specimen #	Control/Fluorosed	Age (yr)	Bone fluoride (mg F ⁻ /kg dry wt)	DLI (Tooth scores for P ₄ , M ₁ , M ₃)
Ca 42	Control	1	149	0 (0, 0, 0)
Ca 38	Fluorosed	1	1686	21 (5, 0, 5)
Ca 37	Fluorosed	3	2965	20 (5, 0, 5)
Ca 01	Fluorosed	4	2786	17 (4, 0, 5)
Ca 24	Fluorosed	4	1755	21 (5, 0, 5)
Ca 36	Fluorosed	4	3790	13 (3, 0, 4)
Ca 39	Fluorosed	4	3591	22 (5, 0, 5)
Ca 41	Fluorosed	5	3340	20 (5, 0, 5)
Ca 30	Fluorosed	8	3634	20 (5, 0, 5)

Table 1. Estimated age, mandibular fluoride concentration, dental lesion index of fluorosis (DLI), and individual tooth scores for the three analyzed teeth in the studied European roe deer.

Tooth score	Features of the teeth
0	Unfluorosed; normal (white and translucent) appearance of enamel. Enamel forms distinct ridges on occlusal surface. Physiological tooth wear.
1	Presence of enamel opacities and (posteruptive) staining of enamel. Changes mainly confined to cuspal tooth regions and sometimes present as horizontal bands.
2	Whole tooth crown affected by enamel opacity and staining. More or less marked reduction in height of enamel ridges on occlusal surface in worn teeth.
3	In addition to enamel opacity and staining, the tooth crown exhibits enamel defects affecting up to 5% of its surface. Flattening of occlusal surface due to marked reduction or even complete loss of enamel ridges in worn teeth.
4	In addition to enamel opacity and staining, the tooth crown exhibits enamel defects affecting up between 5 and 25% of its surface. Markedly increased tooth wear in older individuals that may lead to abnormal shape of the tooth crown.
5	In addition to enamel opacity and staining, the tooth crown exhibits enamel defects affecting more than 25% of its surface. Markedly increased tooth wear in older individuals that may lead to a dysfunctional crown shape.

Table 2. Scoring scheme for classification of the severity of dental fluorosis in the analyzed mandibular cheek teeth (P₄, M₁, M₃) of European roe deer based on the recording of macroscopic dental abnormalities; modified from Kierdorf and Kierdorf (1999).¹⁵

Tooth	Dentin area	Fluoride concentration (wt %)			
		Mean	Median	SD	Range
P₄	peripheral	0.315	0.309	0.140	0.093 – 0.541
	juxtapulpal	0.357	0.255	0.257	0.114 – 0.681
M₁	peripheral	0.039	0.015	0.037	0.015 – 0.107
	juxtapulpal	0.365	0.339	0.233	0.063 – 0.682
M₃	peripheral	0.312	0.376	0.156	0.015 – 0.445
	juxtapulpal	0.321	0.325	0.137	0.133 – 0.533

Table 3. Fluoride concentrations in peripheral (close to enamel) and juxtapulpal dentin of mandibular cheek teeth from fluorotic dentitions of European roe deer (n =8).